

UNIVERSITÉ
DE
NANCY

U. E. R.
DE
PHYSIQUE CHIMIE BIOLOGIE

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Jean - Luc CHARLEUX

OXYDATIONS DE COMPOSÉS PHENOLIQUES
PAR DES BACTÉRIES DE LA PHYLOSPHÈRE

Soutenue le 23 Décembre 1971 devant la Commission d'Examen

JURY

MM. MANGENOT	Président
GARNIER	} Examineurs
METCHE	

UNIVERSITÉ
DE
NANCY

U. E. R.
DE
PHYSIQUE CHIMIE BIOLOGIE

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Jean - Luc CHARLEUX

**OXYDATIONS DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES
PAR DES BACTÉRIES DE LA PHYLLOSPHÈRE**

Soutenue le 23 Décembre 1971 devant la Commission d'Examen

JURY

MM. MANGENOT Président

GARNIER

METCHE

} Examineurs

Nous tenons à exprimer notre respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur MANGENOT qui a bien voulu accepter la présidence de notre thèse après nous avoir fait l'honneur de nous recevoir dans son laboratoire et à Monsieur le Professeur METCHE, maîtres qui nous ont toujours prodigué leurs conseils et leur enseignement.

Qu'il nous soit permis de remercier Monsieur le Professeur GARNIER qui a bien voulu examiner notre travail.

Que Monsieur RIESINGER qui a réalisé les microphotographies électroniques trouve ici tous nos remerciements.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551919_0004

P L A N

<u>Introduction</u>	1 - 2
<u>Première partie : Oxydation des phénols chez les bactéries.</u>	
Données bibliographiques.	3
<u>Chapitre I : Ouverture du cycle :</u>	3
A Mécanismes	3
B Enzymes : Oxygénases	8
<u>Chapitre II : Condensation oxydative :</u>	12
A Mécanismes	12
B Systèmes enzymatiques	13
C Produits de brunissement	15
D Intermédiaires de formation des polymères bruns	18
<u>Deuxième partie : Expériences personnelles.</u>	26
<u>Chapitre I : Matériel et Méthodes</u>	26
A Souches étudiées	26
B Milieux de culture	26
1. solides	26
2. liquides ; essais préliminaires	27
3. méthode de transfert	28
C Préparation d'extraits bruts acellulaires	29
D Mise en évidence des activités enzymatiques	29
<u>Chapitre II : Résultats</u>	32
I Sur milieux solides ; expériences préliminaires	32
II Cultures sur milieux liquides	32
A Nature enzymatique des réactions	32
B Substrats des réactions enzymatiques de brunissement	35
C Rapport C/N ; compétition mannitol-catéchol	38

D Influence de la température et de l'agitation	40
E Concentration en phénols : précultures en présence de phénols	42
F Toxicité du catéchol	47
G Age des cultures, coexistence des deux voies d'oxydation : brunissement et utilisation des phénols	49
<u>Troisième partie : Mécanismes enzymatiques.</u>	58
<u>Chapitre I : Oxygénases :</u>	58
A Monooxygénases	58
B Dioxygénases	60
1. Catéchol	60
1.1. Utilisation du catéchol par 8 souches bactériennes	60
1.2. Mise en évidence d'une catéchol-1-2 oxygénase chez P. acidovorans	61
2. Acide protocatéchique	63
3. Modes d'ouverture du catéchol et de l'acide protocatéchique, métabolisme des produits d'ouverture	67
4. Déterminisme du mode d'ouverture	69
<u>Chapitre II : Phénoloxydases :</u>	71
A Localisation	71
B Microscopie électronique	71
<u>Chapitre III : Caractère constitutif ou inductible des enzymes.</u>	74
A Oxygénases	74
B Phénoloxydases	74
<u>Chapitre IV : Inhibition de l'activité phénoloxydase</u>	77
A Inhibition des chaînes respiratoires	77
B Inhibition avec des complexants du cuivre	79
<u>Chapitre V : Nature du système phénoloxydase</u>	82
<u>Conclusion</u>	87
<u>Bibliographie</u>	93

On a montré voici quelques années (1) que des autolysats de feuilles soumis, dans des conditions aseptiques, à l'action de l'O₂ atmosphérique donnaient naissance à des produits sombres semblables aux substances humiques des sols.

Pourtant, à l'époque, l'opinion la plus courante voulait que les polyphénols végétaux soient si labiles que la microflore du sol les dégrade très vite, avant que la formation de polymères sombres soit appréciable. En effet, in vitro, le noyau aromatique est ouvert facilement par un bon nombre de bactéries et de champignons dont certains sont même capables de se contenter de dérivés aromatiques comme seule source d'énergie et de carbone.

Les pigments incorporés à l'humus seraient donc synthétisés par les microorganismes. Personne ne songerait à dire que, dans les conditions naturelles, les transformations des substances aromatiques ne sont pas sous la dépendance de la microflore : celle-ci intervient sans doute pour :

- transformer les composés naturels en monomères oxydables : clivage de la lignine, hydrolyse des hétérosides, fragmentation des flavonoïdes, etc...

- dégrader les monomères avec libération d'acides aliphatiques alimentant le TCA.

- remanier les polymères formés par autooxydation : c'est le problème encore bien mal connu de la maturation des substances humiques et de leurs précurseurs.

- catalyser la condensation oxydative des monomères.

C'est sur ce dernier point que nous mettrons l'accent ici.

Les données de la bibliographie montrent que nombre de microorganismes sont capables d'oxyder les monophénols et surtout les diphénols en donnant des produits sombres.

C'est le cas :

- des champignons fuligineux synthétisant les mélanines qui incrustent les parois de leurs hyphes ou de leurs spores.

...

- des champignons des pourritures blanches produisant des phénoloxydases diffusibles. Ce trait ne leur est sans doute pas absolument particulier mais la réaction de RAVENDAMM qui repose sur cette aptitude donne une bonne présomption de l'appartenance à ce groupe des souches qui la présentent.

On connaît encore l'aptitude de certaines bactéries de former, à partir des composés aromatiques, des produits bruns.

C'est le cas d'Azotobacter chroococcum cultivé par WINOGRADSKY (2) sur benzoate de soude et étudié plus récemment par HARDISSON et POCHON (3). C'est encore celui de Micrococcus varians (4), d'Arthrobacter ureovorax (5), de divers Agrobacterium (6) de certaines souches d'Enterobactéries (E. coli (7) - groupe Proteus Providencia (8)), de Streptomyces (9), (10).

Mais ici, les systèmes impliqués dans le brunissement sont beaucoup moins bien connus (11) et la production de substances sombres ne semble pas être le résultat d'une activité constante et essentielle de l'organisme.

Quoi qu'il en soit, les microorganismes capables de provoquer la polymérisation oxydative des phénols sont nombreux dans les sols (11) dans les litières et dans la phyllosphère (12). Une simple macération aqueuse anaérobie de feuilles vivantes fournit des liqueurs qui l'oxydent spontanément à l'air en se colorant mais dont le brunissement est encore fortement accentué par 60 % des souches capables de croître sur ces mêmes extraits gélosés. Cependant la condensation oxydative n'est pas immédiate dans ces conditions. Elle semble être un processus secondaire précédé par une phase de décoloration du milieu. Autour de la jeune colonie, apparaît d'abord un halo clair, bientôt entouré d'un deuxième halo sombre qui grandit progressivement. De plus, l'aptitude à produire cette réaction n'est pas liée à la production d'oxydases mises en évidence par le test de KOVACS à la tétraméthylparaphénylènediamine.

Toutes ces remarques nous ont incité à entreprendre l'étude de quelques souches isolées de la phyllosphère et capables de provoquer le brunissement des extraits végétaux.

OXYDATION DES PHENOLS CHEZ LES BACTERIES.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.

Nous étudions d'abord l'ouverture du cycle benzénique, étape clé du métabolisme des composés phénoliques puis, dans un deuxième chapitre, la formation de composés mélanoides.

I OUVERTURE DU CYCLE

La dégradation de composés aromatiques par les microorganismes capables de couper le cycle benzénique constitue une étape essentielle du cycle du carbone.

La lignine, copolymère complexe, formée d'unités C_6-C_3 de type phényl propane, est la principale source naturelle de composés aromatiques. C'est dans le sol que ces substances sont métabolisées par bactéries et champignons ; aussi, de nombreux microorganismes capables d'utiliser des composés aromatiques comme seule source de carbone (pour leur croissance sur des milieux minéraux) ont-ils été isolés du sol ; parmi les bactéries, les Pseudomonas apparaissent les plus actifs (13).

Aux composés aromatiques naturels, l'activité humaine ajoute des composés synthétiques, détergents herbicides, ... la biodégradation ou la détoxification de ces composés se révèle, aujourd'hui, indispensable à la défense de "l'environnement".

A Mécanismes :

A l'exception du photométabolisme anaérobie de l'acide benzoïque par Rhodopseudomonas palustris (14). (15) et de l'utilisation d'acides aromatiques par des bactéries produisant du méthane, l'oxygène moléculaire est l'oxydant obligatoire.

D'études récentes (16), (17), (18) sur l'utilisation par les microorganismes de substrats aromatiques en fonction de leur structure, ne se dégage aucune règle générale si ce n'est la haute spécificité des mécanismes impliqués dans ces

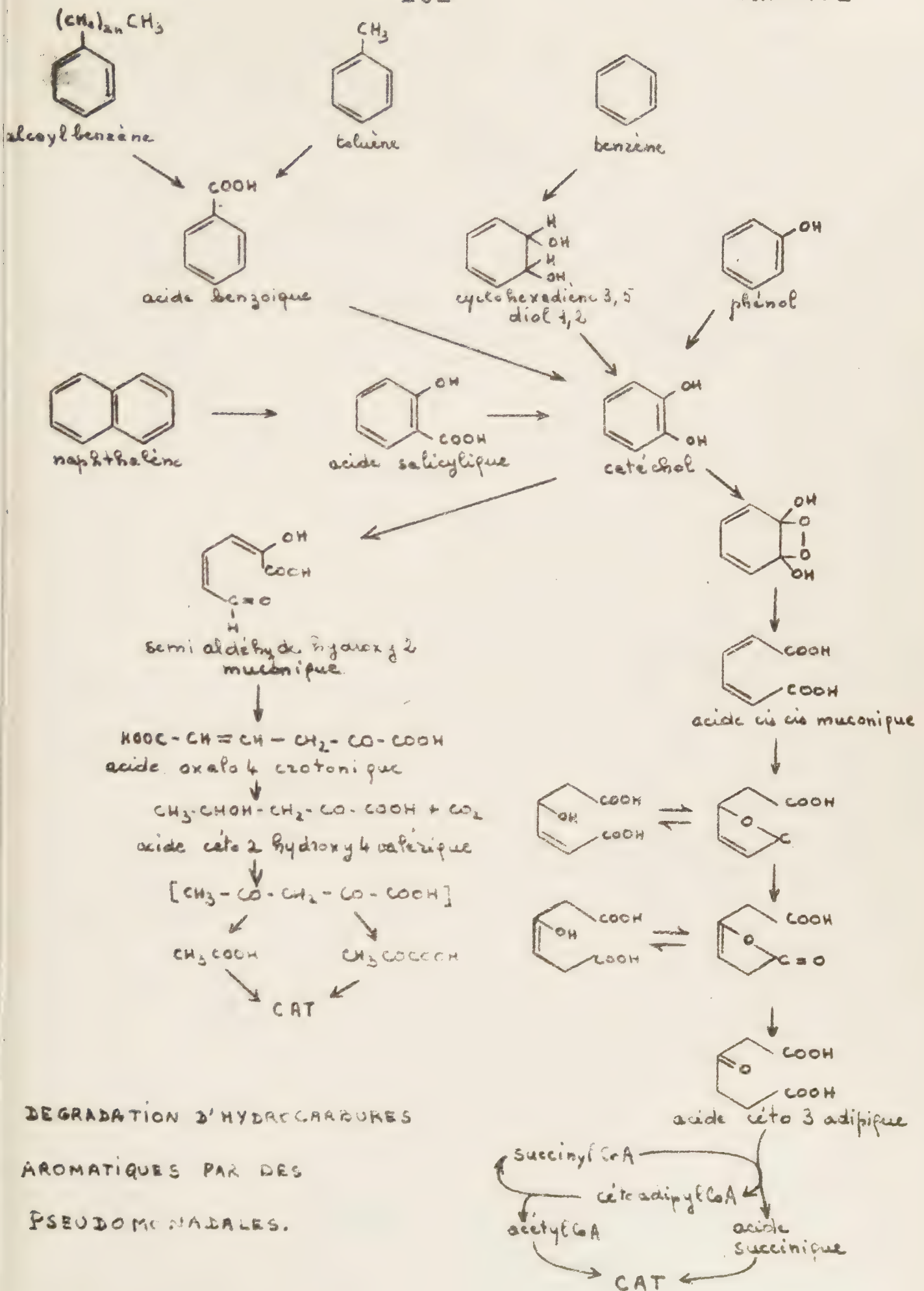
...

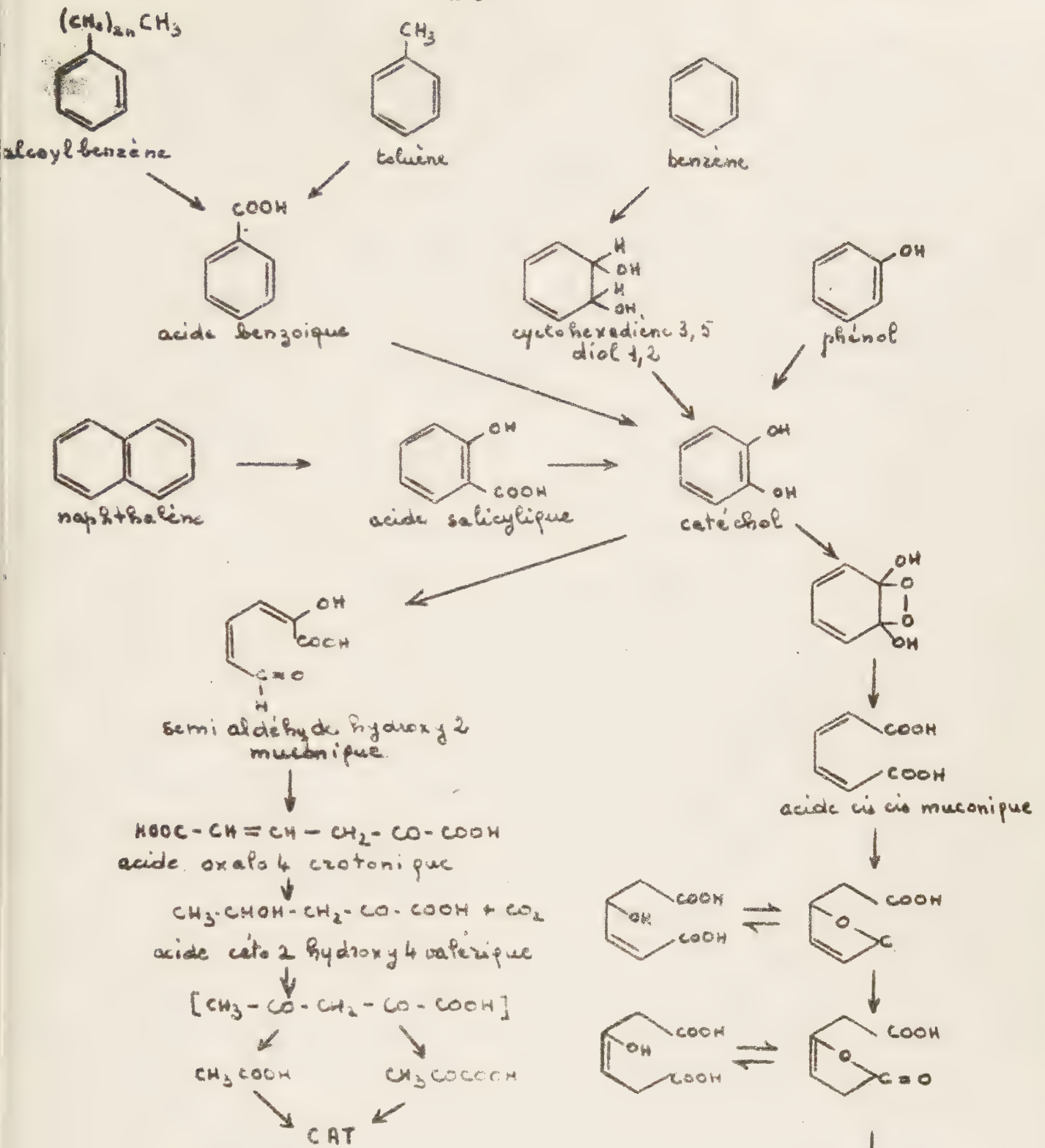
dégradations. Nous savons que le nombre de groupements OH, que la nature et le nombre des substituants interviennent non seulement dans la capacité d'utilisation mais dans le choix des voies métaboliques empruntées qui sont nombreuses et complexes : si certains Pseudomonas métabolisent le p. crésol en transformant le groupement méthyle en groupement carboxyle puis, après une hydroxylation en C₃ ouvrent le cycle avec l'aide d'une protocatéchique 4,5 oxygénase (19), d'autres Pseudomonas laissant intact le groupement méthyle, dégradent le p. crésol via le 4 méthyl catéchol qui est ouvert par une catéchol 2 - 3 oxygénase (20). BLAKLEY et coll. ont montré l'influence de la longueur de la chaîne latérale, l'hydroxylation de l'acide phénylacétique a lieu en position para (21) tandis qu'elle a lieu en position méta pour l'acide phényl propionique chez une même souche de Pseudomonas (22).

Mais, la plupart des voies d'attaque microbienne des composés aromatiques, si variées soient-elles, comportent généralement des séries de réactions qui conduisent finalement à la formation d'un dihydroxyphénol (cf planche I et II le catabolisme de différents composés aromatiques par des Pseudomonas) ; les substrats aromatiques sont transformés à la suite d'hydroxylation, de décarboxylations en dérivés ortho ou para hydroxylés puis, après ouverture du cycle, en acides aliphatiques qui sont finalement introduits dans le cycle des acides tricarboxyliques (23). Les voies du métabolisme oxydatif des composés aromatiques dihydroxylés sont beaucoup moins complexes que celles qui convergent vers ces diphénols ; on a pu établir une séquence générale de dégradation des catéchols (24).

La présence de deux groupements hydroxylés est un préliminaire nécessaire à la coupure enzymatique du cycle benzénique (25) ; et même si les ouvertures des acides gentisique (26), (27), caféique (28) et 2,3 dihydroxy benzoïque (29), (30) ont été décrites, le catéchol et l'acide protocatéchique apparaissent comme des intermédiaires clé.

Ces dihydroxyphénols, résistant à l'attaque de nombreux réactifs grâce à la stabilité de leur molécule sont facilement ouverts et métabolisés par des microorganismes.

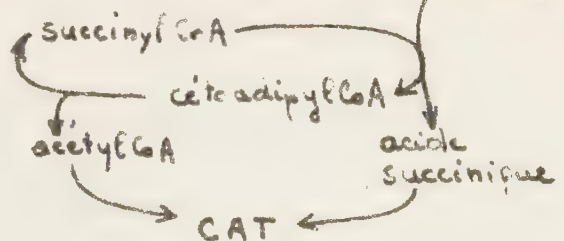


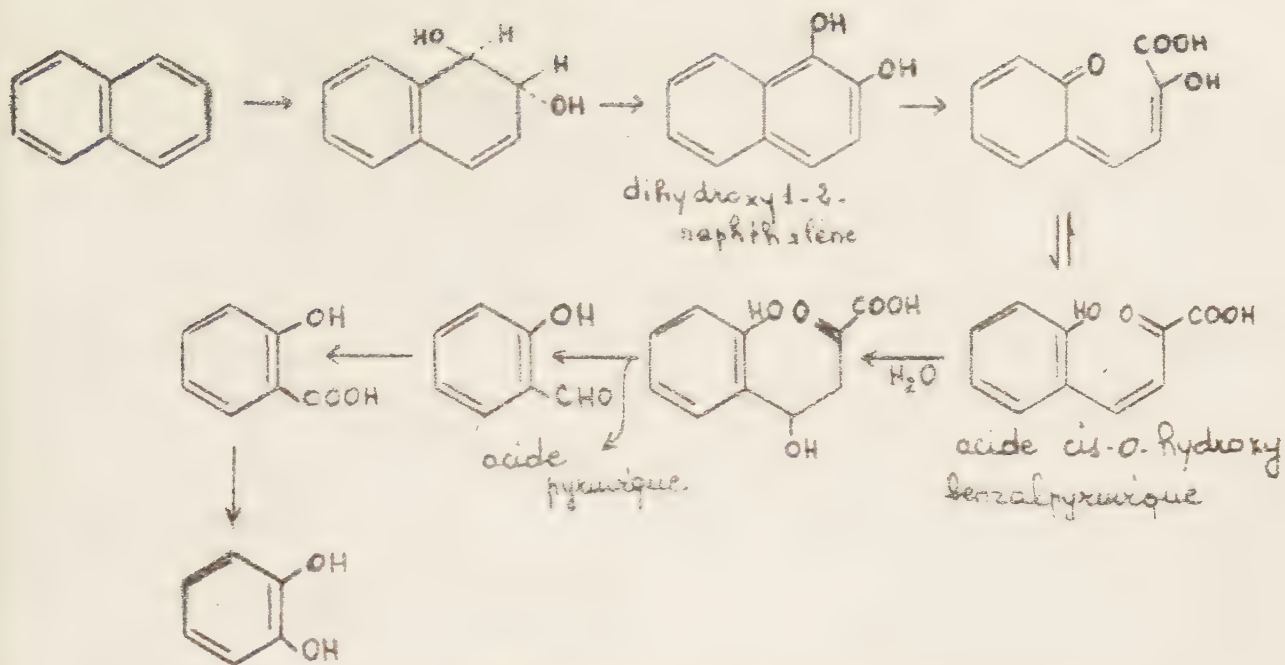


DEGRADATION D'HYDROCARBURES

AROMATIQUES PAR DES

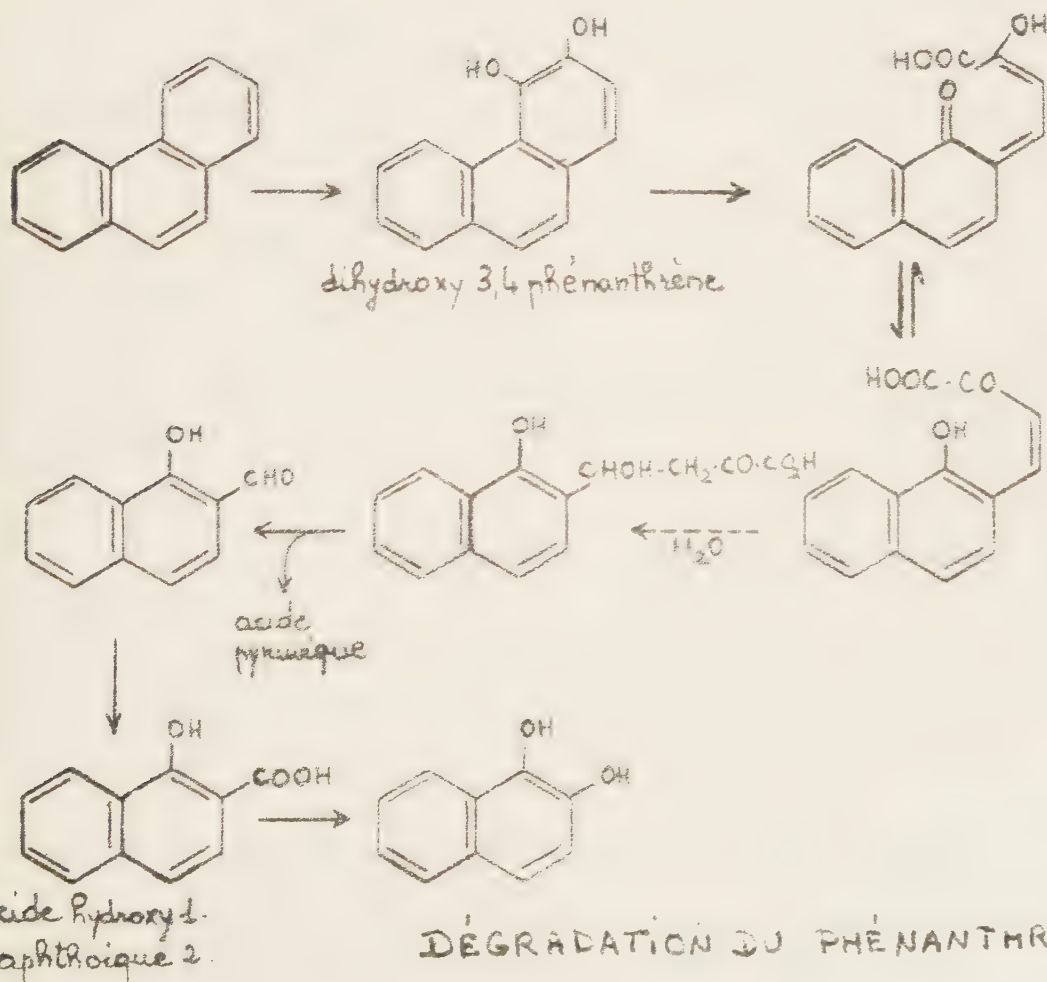
PSEUDOMONADALES.





DÉGRADATION DU NAPHTALÈNE

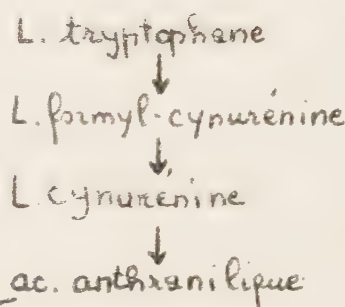
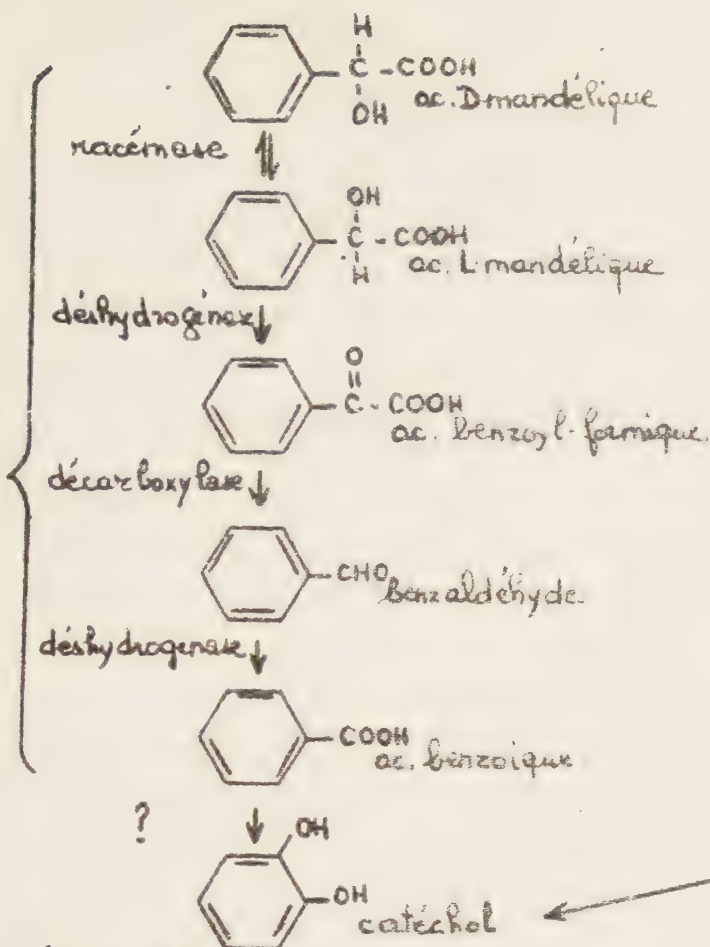
PAR UN Pseudomonas.



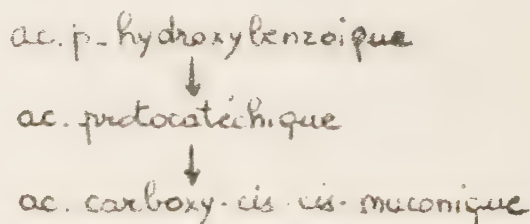
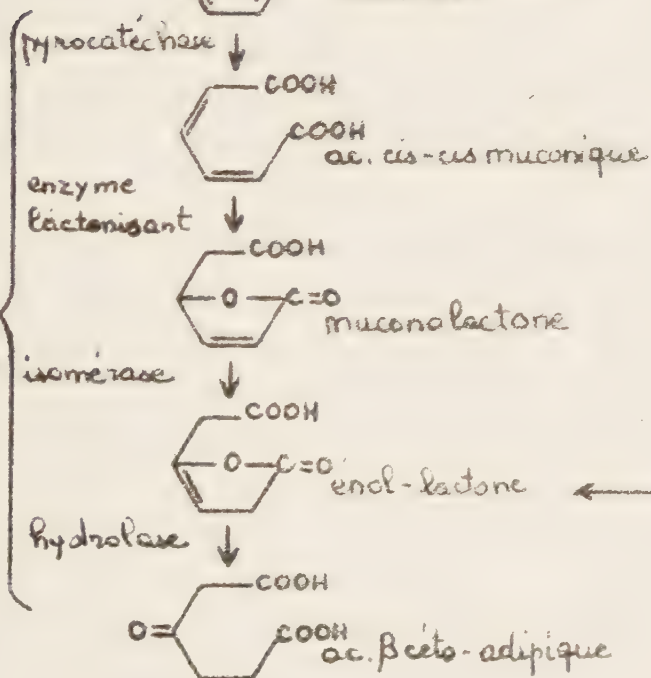
DÉGRADATION DU PHÉNANTHRÈNE

PAR UN Pseudomonas.

Enzymes du groupe du mandélate



Enzymes du groupe du catéchol



Les voies du mandélate, du tryptophane et de l'acide p-hydroxy-benzoïque chez Pseudomonas fluorescens.

B Enzymes :

De plus, la nature comme l'induction des enzymes impliquées dans la formation puis la dégradation des dihydroxyphénols présentent un grand intérêt .

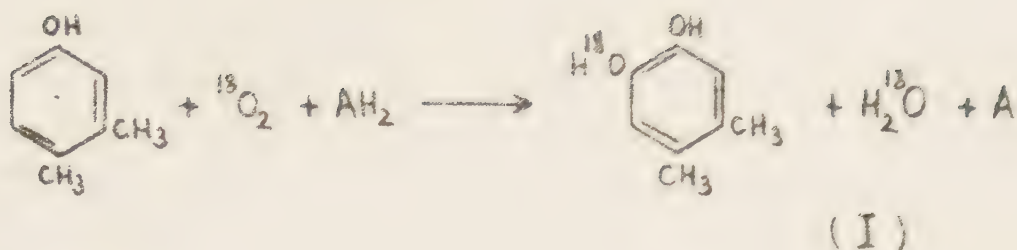
Les enzymes qui font passer des composés aromatiques aux dihydroxyphénols, des dihydroxyphénols aux métabolites du C.A.T. ne sont appelées à fonctionner que lorsque la croissance se fait aux dépens de composés aromatiques particuliers, elles sont absentes lors de la croissance sur succinate ou glucose. Ainsi la croissance sur des composés aromatiques nécessite l'élaboration de batteries complètes d'enzymes et les bactéries capables d'utiliser de tels métabolites se montrent un excellent matériel pour l'étude des facteurs qui régissent la synthèse des systèmes multienzymatiques. Chez Pseudomonas fluorescens, STANIER et coll. (31) ont montré la coexistence d'une induction séquentielle (série d'inductions isolées en cascade) et d'une induction coordonnée (caractérisée par la co-induction de plusieurs enzymes fonctionnellement liées) dans la voie du mandélate (cf planche III).

Qu'elles résultent d'une induction coordonnée ou séquentielle, les adaptations simultanées fournissent une méthode générale d'étude des voies métaboliques (32).

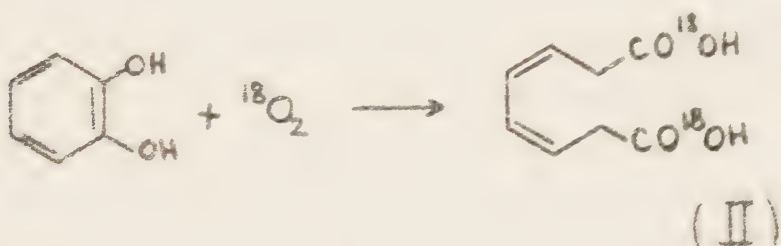
Alors que les deshydrogénases catalysent le transport d'électrons ou d'ions hydrures de donneurs à des accepteurs variés, les oxydoréductases qui interviennent dans la formation et l'ouverture des dihydroxyphénols catalysent l'incorporation directe d' O_2 moléculaire dans les molécules de substrat (33).

OXYGENASES

C'est en 1955 que MASON (34) montrait que l'atome d'oxygène d'un groupement hydroxyle du 4 - 5 diméthyl catéchol, produit d'oxydation du 3 - 4 diméthyl phénol par le complexe phénolase, provenait d'oxygène moléculaire



La même année, HAYAISHI (35) établissait que les 2 atomes d'oxygène fixés au catéchol par l'action de la pyrocatechase provenaient exclusivement de l'oxygène atmosphérique :



Ces découvertes, faites en utilisant ${}^{18}\text{O}_2$ et $\text{H}_2{}^{18}\text{O}$, bouleversaient la théorie que WIELAND avait formulée en 1932 dans son livre "On the mechanism of oxidation", théorie acceptée jusqu'alors :

"l'oxygène moléculaire peut servir seulement d'accepteur terminal d'électrons, tous les atomes d'oxygène incorporés dans les substrats proviennent des atomes d'oxygène de l'eau".

En effet, ces deux réactions (I et II) impliquent l'addition directe de l'oxygène à une molécule de substrat, elles sont semblables aux réactions d'oxygénation connues en chimie ; HAYAISHI a proposé le terme d'oxygénase pour désigner les enzymes qui catalysent ces réactions.

Alors que les deshydrogénases et les oxydases participent principalement au métabolisme énergétique et à la production d'ATP, les oxygénases interviennent surtout dans la synthèse de métabolites essentiels et dans l'oxydation de composés toxiques. Elles jouent un rôle important non seulement

dans l'oxydation de composés aromatiques variés et d'autres composés cycliques mais aussi dans le métabolisme de composés aliphatiques. Elles agissent sur des acides aminés, des sucres, des acides gras, des hydrocarbures, des stéroïdes, des hormones, etc... Elles interviennent même dans l'oxydation de composés inorganiques : oxydation du S en thiosulfate par Thiobacillus thiooxidans

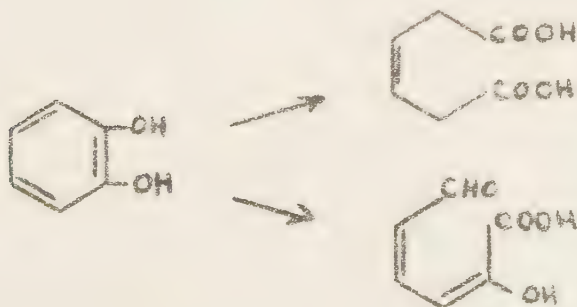


Dioxygénases :

On distingue les dioxygénases qui catalysent l'addition de deux atomes d'oxygène par molécule de substrat (la pyrocatéchase étudiée par HAYAISHI est de ce type).

Si les oxygénases ont des fonctions variées, l'ouverture du cycle benzénique est exclusivement le fait des dioxygénases (37). Un grand nombre de ces enzymes, contenant du fer comme seul cofacteur, catalysent l'insertion de deux atomes d'oxygène dans des composés aromatiques variés et, comme le noyau benzénique est coupé oxydativement par ces enzymes, on les appelle souvent des dioxygénases phénolytiques. L'autre groupe de dioxygénases contient de l'hème à la place du fer inorganique.

Deux modes d'ouverture du cycle des composés o. hydroxylés ont été décrits ; l'un entre les deux atomes de carbone porteurs des groupements hydroxyles, l'autre, entre un atome de carbone porteur d'un groupement hydroxyle et un carbone adjacent porteur d'un hydrogène :



Monooxygénases :

Les monooxygénases ou hydroxylases catalysent l'incorporation d'un atome d'oxygène, elles ne fonctionnent qu'en la présence d'un donneur d'électrons approprié, elles sont spécifiques de NADH, H^+ comme la salicylate hydroxylase étudiée par YAMAMOTO et coll. (38) - l'équation ci-contre montre le mécanisme de l'oxydation du salicylate (39) - ou spécifiques de NADPH, H^+ comme la p. hydroxybenzoate hydroxylase de Pseudomonas desmolytica (40).



Elles sont localisées, pour la plupart, dans la fraction particulaire des cellules.

II CONDENSATION OXYDATIVE

Si nous connaissons bien les voies microbiennes d'utilisation des substrats phénoliques, si nous connaissons les enzymes qui s'y trouvent impliquées, l'autre voie d'oxydation des phénols, la copulation oxydative demeure obscure.

Pourtant l'oxydation enzymatique puis la copulation des phénols sont les réactions clé des voies de biosynthèse d'un grand nombre de produits naturels : tannins, lignines, mélanines, pigments, antibiotiques et alcaloïdes.

La condensation oxydative de composés phénoliques est aussi à l'origine de la formation des substances humiques.

A Mécanismes :

Comme dans la voie précédente, la formation des pigments sombres est précédée, s'il est nécessaire, d'étapes de dégradation : clivage de la molécule de lignine, ouverture du cycle intermédiaire des flavonoïdes et libération des noyaux aromatiques, coupure des chaînes latérales, hydroxylation.

KONONOVA (41) attribue le brunissement des feuilles mortes à l'action des polyphénoloxydases produites par les très nombreuses bactéries peuplant les tissus nécrosés et pense que les formes actives seraient les myxobactéries cellulolytiques.

Mais, seuls les polyphénols ou leurs dérivés possédant des groupements OH en ortho ou para c'est-à-dire capables de s'oxyder directement en quinone (pyrocatechine, pyrogallol, hydroquinone, acide gallique) donnent lieu à des réactions de brunissement : les phénols dont les groupements hydroxyles sont en méta ou bien qui sont méthoxylés (phloroglucinol, résorcinol, guaiacol) ne s'oxydent pas.

Dans nos propres expériences, le brunissement n'a jamais lieu en présence de monophénols ni de diphénols ayant leurs groupements hydroxylés en méta mais seulement avec un p. diphénol et des o. diphénols.

Utilisant des substrats aussi variés que le phénol, le benzène, le résorcinol, l'acide benzoïque, l'acide salicylique, le benzaldéhyde, l'acide protocatechique, Micrococcus varians élabore un pigment semblable aux mélanines (4) : s'il

ne s'agit pas de diphénols, nous savons que l'utilisation des composés aromatiques passe par la formation de diphénols : la présence de catéchol dans les cultures de M. varians sur phénol est décelée.

En culture sur l'acide hippurique ou benzoïque, Arthrobacter ureovorans produit un pigment brun, mais, dans ces deux cas, du catéchol est mis en évidence dans les milieux d'incubation (5).

Dans la dégradation de l' α conidendrine par un Agrobacterium (6), après 3 heures d'incubation, de l'acide isovanillique et de l'acide protocatéchique sont mis en évidence dans les filtrats de culture avant la formation de composés bruns.

Durant la culture sur milieu contenant du tryptophane de plusieurs souches d'Escherichia coli (7) et d'entérobactéries du groupe Proteus Providencia (8), il y a formation d'un pigment brun rouge : nous savons que le catéchol est un intermédiaire de la voie de dégradation du tryptophane. Lors de la formation de mélanines par Streptomyces lavendulae en présence de tryptophane, MENCHER et HEIM (9) pensent que le catéchol serait oxydé par une tyrosinase.

Rappelons que la 3 - 4 dihydroxyphénylalanine (DOPA) est le premier intermédiaire de la formation de la mélanine à partir de la tyrosine.

C'est donc l'oxydation des phénols et, le plus souvent des o. diphénols qui est à l'origine des réactions de brunissement.

E Systèmes enzymatiques :

Quant aux systèmes enzymatiques impliqués dans ces réactions, leur nature est encore assez mal connue et leur nomenclature manque d'unité et de clarté.

En 1963 N.A. BURGESS écrit qu'il est commun de diviser les phénol oxydases en deux groupes :

1. les enzymes de type tyrosinase avec deux activités, l'une crésolase, l'autre catécholase qui correspondraient à deux sites actifs (42).
2. les enzymes du type laccase qui, en plus des

o. diphénols ont comme substrat des p. diphénols et même des triphénols comme le pyrogallol.

Il ajoute que les peroxydases oxydent un grand nombre de mono et diphénols et que des catalases peuvent aussi oxyder des phénols comme le pyrogallol, le p. crésol et le catéchol (43).

Dans le même ouvrage, ENZYME CHEMISTRY OF PHENOLIC COMPOUNDS. BENDALL et GREGORY (44) distinguent 3 classes principales de phénol-oxydases :

- les catéchol oxydases qui ont seulement les o. diphénols pour substrat
- les crésol ou tyrosine oxydases
- les laccases qui présentent la plus large des spécificités de toutes les phénol-oxydases elles oxydent non seulement o. et p. diphénols quelquefois des m. diphénols et des monophénols mais aussi l'acide ascorbique et la p. phénylène-diamine. Ils ajoutent que toutes les phénol oxydases connues oxydent les o. diphénols en o. quinones.

En 1967, pour BROWN (45) trois classes principales d'enzymes catalysent l'oxydation des phénols : les laccases, les tyrosinases, les peroxydases ; il mentionne encore l'acide ascorbique oxydase et la catalase mais souligne que ce n'est pas la fonction principale de ces deux dernières enzymes.

NICOLAUS en 1968 estime que si l'on a donné des noms variés aux polyphénol oxydases responsables de la formation de mélanines, comme tyrosinase, polyphénol oxydase, complexe phénolase, système phénolase, catéchol oxydase ou DOPA oxydase, ce sont en fait des o. diphénol : O_2 oxydoréductases.

Remarquons que l'appellation donnée à la laccase, p. diphénol : O_2 oxydoréductase ne traduit nullement son activité envers le p. crésol par exemple : remarquons encore que la tyrosinase est classée comme une o. diphénol : O_2 oxydoréductase E.C.1.10.3.1, dénomination qui ne rend pas compte de la fonction monophénol hydroxylase de cette enzyme. Il est vrai que s'affrontent toujours deux écoles quant à cette fonction monophénol hydroxylase ; l'une nie le caractère enzymatique de l'hydroxylation (46), (47) -celle-ci serait seulement le résultat d'une réaction entre o. quinone et monophénol- que l'autre met en évidence (48) -les deux activités de la tyrosinase correspondraient à deux molécules protéiques différentes mais

étroitement associées plutôt qu'à deux sites actifs d'une même protéine (49).

Les connaissances concernant les structures chimiques les propriétés physicochimiques, la spécificité, les mécanismes stériques et électroniques d'action des phénol oxydases sont réduites. Les plus étudiées, la tyrosinase et la laccase n'ont jamais été obtenues à l'état pur. Différentes interprétations, classifications, des contradictions mêmes, en sont, nous venons de le voir, la conséquence.

C Produits de brunissement :

Sans nous attarder sur des propriétés ou des structures qui ne sont pas l'objet de cette étude, nous rapportons ce que nous savons, aujourd'hui de ces produits bruns.

Leurs structures sont, pour la plupart, inconnues ou mal connues ; c'est pourquoi, pour les désigner, on use de termes vagues : composés brun noir, complexes très colorés, composés quinonoïdes bruns, mélanines... Il est même difficile de préciser ce qu'on entend par mélanines.

Pour THOMAS, ce sont des pigments noirs, azotés, dérivés de l'indole (50) ; pour MASON (51), ce sont des pigments de poids moléculaire élevé, formés par oxydation enzymatique des phénols, combinés ou non à des protéines, c'est-à-dire des produits de polymérisation de quinones formées sous l'action d'enzymes. Cette dernière définition exclut les pigments noirs formés par autoxydation, accepte comme mélanine le produit noir d'oxydation enzymatique du catéchol. SWAN (52) remarquant qu'aucune mélanine formée in vivo ou in vitro n'a encore été isolée comme un composé chimique unique, de composition définie, écrit que la plupart des mélanines sont probablement des polymères complexes.

Pour NICOLAUS (53), les mélanines sont des mélanges de différentes macromolécules composés d'unités hétérogènes liées entre elles par plus d'un type de liaison ; en général, les pigments noirs sont des produits d'oxydation de diphénols, comme la DOPA, le 5 - 6 dihydroxyindole, le catéchol et le 1 - 8 dihydroxynaphtalène qui donnent naissance à des quinones possédant de nombreux sites actifs de polymérisation - ceci est une condition nécessaire à l'obtention de pigments noirs, les

composés dans lesquels il n'existe qu'un petit nombre de sites actifs donnent des pigments bruns, brun-rouge, ou même jaune-brun. NICOLAUS distingue les eumélanines, les phaeomélanines et les allomélanines ; la tyrosine est le précurseur des eumélanines tyrosine et cystéine sont les précurseurs des phaeomélanines.

Les allomélanines sont formées à partir de précurseurs qui ne contiennent pas d'azote mais des protéines peuvent intervenir dans le processus de polymérisation ; des quinones sont aussi des intermédiaires de la synthèse des allomélanines. Leur dégradation donne naissance à du catéchol ce qui suggère que l'o. diphénol joue le même rôle dans la synthèse des allomélanines que la DOPA dans la formation des eumélanines.

La comparaison de pigments de Streptomyces (9) avec des Dopamélanines (mêmes propriétés chimiques, physiques et spectrales) ou la mise en évidence d'activités tyrosinase chez des Pseudomonas (54) et chez Bacillus cereus (55) laissent à penser que des microorganismes sont capables de synthétiser de "vraies" mélanines. Cependant, la plupart des pigments brun-noir microbiens sont des allomélanines :

Le squelette carboné du perylène constitue l'unité essentielle du pigment élaboré par Aspergillus niger ; ceci est en accord avec la capacité des Ascomycètes à synthétiser le 1,8 dihydroxynaphtalène : or, in vitro, ce composé peut très facilement être oxydé en une structure perylène-quinone :

Le pigment noir produit par les spores d'Ustilago maydis peut être considéré comme un polymère irrégulier fait d'unités catéchol à des stades variés d'oxydation liées entre elles par des liaisons C - C et C - O - C ; c'est le premier polymère naturel de ce type (56).

NICHOLS et CAMPBELL (57) comparent le pigment brun obtenu par culture de Micrococcus violagabriellae sur milieu au p. crésol aux pigments produits par deux souches de Pseudomonas aeruginosa qui sont de vraies mélanines. Les trois pigments présentent les mêmes spectres continus d'absorption entre 200 et 700 mμ, la même capacité à réduire le nitrate d'argent ammoniacal, ils sont tous trois décolorés par l'eau oxygénée à 5 % ; mais les cultures et les extraits acellulaires des Pseudomonas se montrent actifs envers la tyrosine et la DOPA tandis que le Micrococcus ne l'est pas.

Micrococcus varians, en culture sur un milieu contenant 0,1 % de phénol, élabore un pigment brun, (la pigmentation est très réduite en présence de tyrosine) soluble dans le butanol, pas complètement soluble dans l'acétate d'éthyle : dans cette dernière fraction, le 3,4 3',4' tétrahydroxydiphényl est mis en évidence (4).

Dans la dégradation de cyclolignanes par des bactéries du genre Aerobacterium, un pigment brun amorphe est synthétisé, il n'est pas soluble dans le butanol, il précipite dans l'acide dilué (6).

Des Achromobacter pigmentés en jaune cultivés sur l'acide hippurique ou sur l'acide benzoïque ou m. hydroxybenzoïque produisent un pigment brun sombre soluble qui contient des unités catéchol (5).

NICOLAUS place les acides humiques dans les allomélanines et, de fait, de nombreuses ressemblances existent entre ces derniers et les pigments produits par des cultures microbiennes en présence de phénols. Structures et formations sont voisines puisqu'on admet aujourd'hui que le noyau des acides humiques consiste en produits phénoliques polymérisés dérivant de polyphénols par un processus oxydatif.

VINOGRADSKY (2) avait suggéré le premier l'existence d'analogies entre la substance noire produite par Azotobacter cultivé sur du benzoate et les substances humiques : une comparaison établie plus tard fondée sur les caractères physicochimiques conclut à une analogie frappante entre ces deux substances (58) : cette comparaison reprise encore (59) conduit aux mêmes résultats :

- analogie des propriétés physicochimiques : couleur, caractère colloïdal, solubilité dans des solutions alcalines, formation de précipités par l'addition d'acides, dimensions moléculaires.
- analogie des principaux caractères chimiques.
- analogie des spectres d'absorption : dans l'U.V., le visible et dans l'Infra Rouge.

Cette comparaison porte sur les extraits humiques de trois sols différents et sur la substance para humique synthétisée par Azotobacter chroococcum cultivé sur benzoate de sodium.

Une étude comparative du pigment produit par A. niger et d'acides humiques conduit à la conclusion que ces composés appartiennent à la même classe de polymères naturels bien qu'ils soient formés d'unités monomères différentes.

Le pigment brun synthétisé lors de la dégradation de cyclolignanes par des bactéries du genre Aprobacterium (6) ressemble aussi aux acides humiques.

Enfin les spectres de résonance paramagnétique et Infra Rouge des quatre classes de macromolécules naturelles suivantes : mélanines, tannins, lignine et acides humiques d'une part et d'hydroxyquinones d'autre part, se sont révélés semblables (60).

Que les phénols proviennent de la dégradation de la lignine, d'autres substrats aromatiques d'origine végétale, ils sont donc à l'origine de la synthèse de substances para humiques par des microorganismes ; les analogies entre ces substances et le noyau central caractéristique des substances humiques montrent la participation des microorganismes à la formation des polymères humiques.

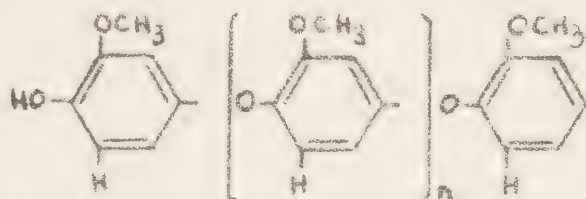
D Intermédiaires de formation des polymères bruns :

ROBSON et SWAN (61) comparent des mélanines obtenues par oxydation enzymatique à pH 6,8 et par autoxydation à pH 8 de la DOPA, de la Dopamine et du 5,6 dihydroxyindole. Ils concluent qu'il n'existe aucune différence fondamentale tant en ce qui concerne les mécanismes de formation que les structures et que les différences sont peut-être quantitatives plus que qualitatives.

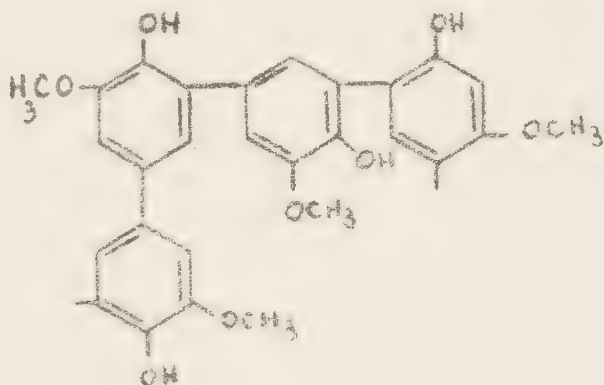
FORSYTH et OUESNEL (62) déterminent trois isomères du tétrahydroxydiphényl, intermédiaires dans l'oxydation enzymatique du catéchol en "catéchol mélanine". Ces trois intermédiaires, dans la formation de pigments bruns mélanoides, sont obtenus soit par action de la tyrosinase soit par oxydation chimique avec le nitrate d'argent. FORSYTH, OUESNEL et ROBERTS (63) poursuivant l'étude des intermédiaires de cette oxydation montrent l'existence de la diphénylènedioxyde 2,3 quinone formée aussi par oxydation avec l'iodate de sodium. L'existence d'un autre intermédiaire à 4 noyaux benzéniques ne fait plus de doute (64).

L'autoxydation de la catéchine ou son oxydation par la laccase ou la tyrosinase donnent le même polymère brun jaunâtre avec la formation des mêmes intermédiaires (65), (66).

L'oxydation du guaïacol par l'oxyde d'argent ou le ferricyanure de potassium conduit à la formation du polymère ci-dessous :



Dans les produits d'oxydation par le persulfate de sodium ou par la laccase, c'est l'unité ci-dessous qui prédomine dans les polymères formés (67).



Que l'oxydation soit le résultat d'une autoxydation, d'une oxydation chimique ou d'une oxydation enzymatique, nous voyons, qu'en général, les mécanismes comme les produits formés sont les mêmes.

Nous savons aussi que ces derniers sont le plus souvent des mélanges complexes de molécules présentant des degrés de polymérisation divers.

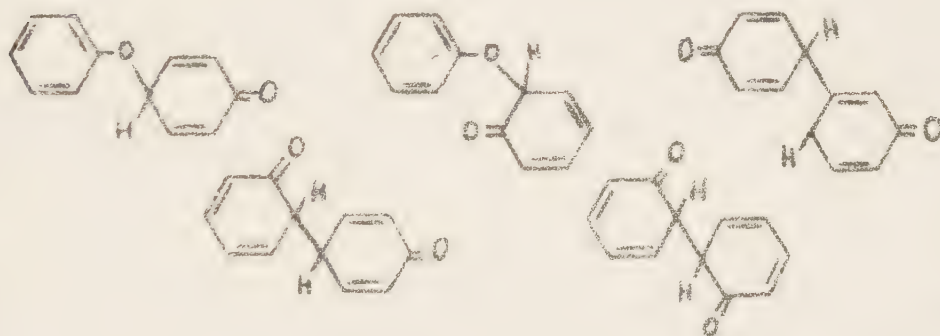
C'est la formation de radicaux libres aryloxy, première étape de l'oxydation de tout phénol qui explique ces deux caractères.

...

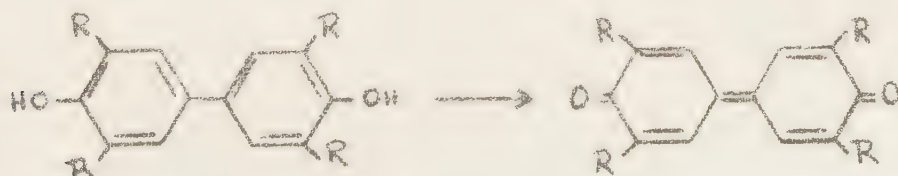
PUMMERER, le premier à entreprendre des études systématiques, suggéra l'existence de ces radicaux libres ; l'observation des sites de copulation (positions ortho et para mais non méta) montre qu'un radical libre aryloxy est réactif seulement sur l'oxygène et les atomes de carbone en ortho et para ; aussi pouvons-nous écrire les structures de résonance qui symbolisent une densité électronique élevée de l'électron non apparié en ces positions :



La combinaison de deux radicaux donne des dimères ; de la même façon, se forment trimères et polymères :

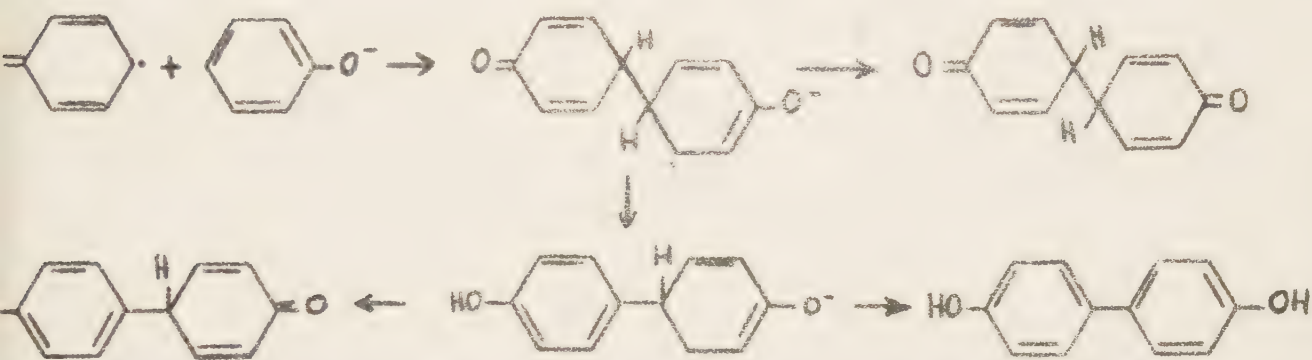


Si le potentiel d'oxydoréduction est suffisamment élevé, les dimères avec une liaison C - C peuvent être oxydés plus avant en quinones :

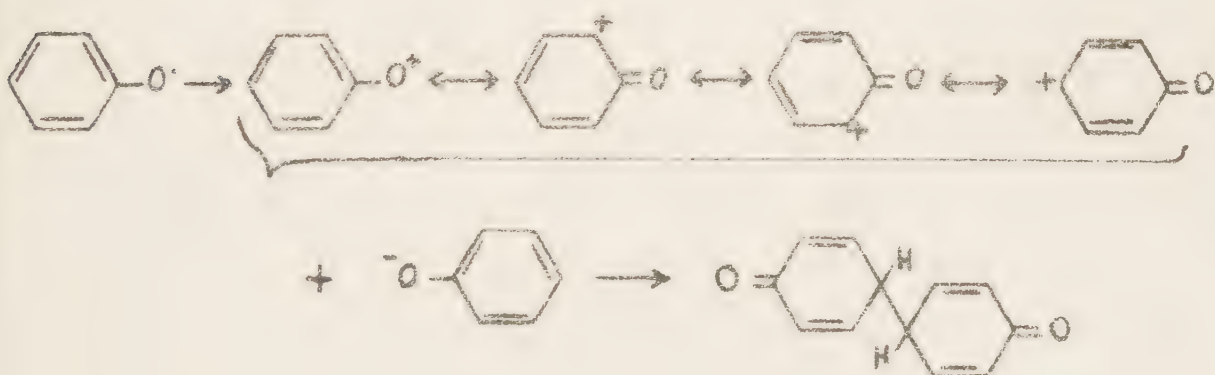


Deux autres mécanismes sont possibles :

a) Un radical aryloxy peut se combiner avec un ion phénate ou un phénol pour donner des radicaux dimères qui sont à leur tour oxydés ; c'est une voie possible lors d'une oxydation lente, quand le radical libre est en présence d'une concentration élevée de phénols, d'une concentration très faible de radicaux :



b) Si un radical libre aryloxy est oxydé en cation puis réagit avec un phénol ou un anion phénolate, il y a formation de dimères :



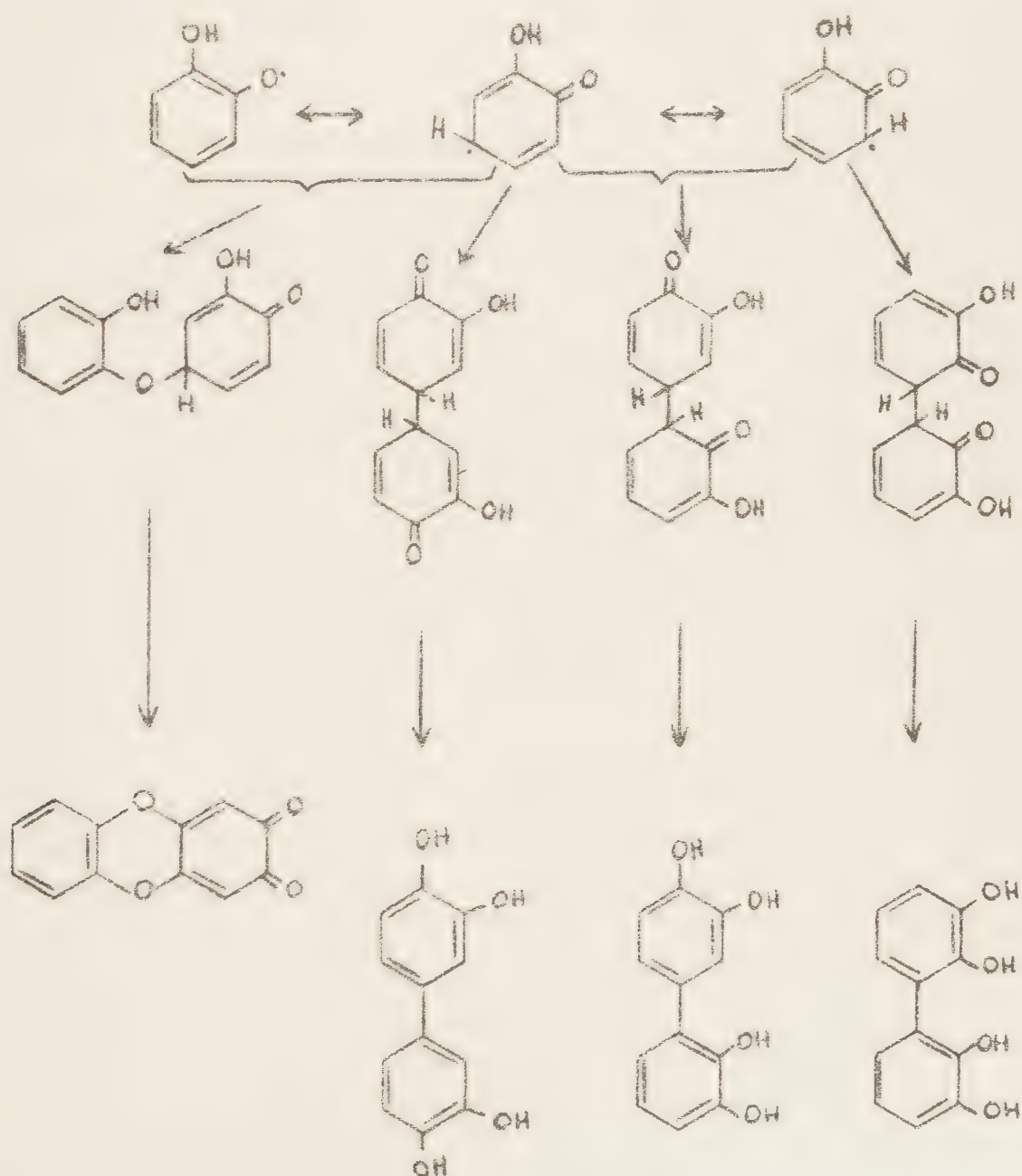
L'oxydation d'anions phénolates en radicaux libres aryloxy qui réagissent entre eux pour former des polymères,

...

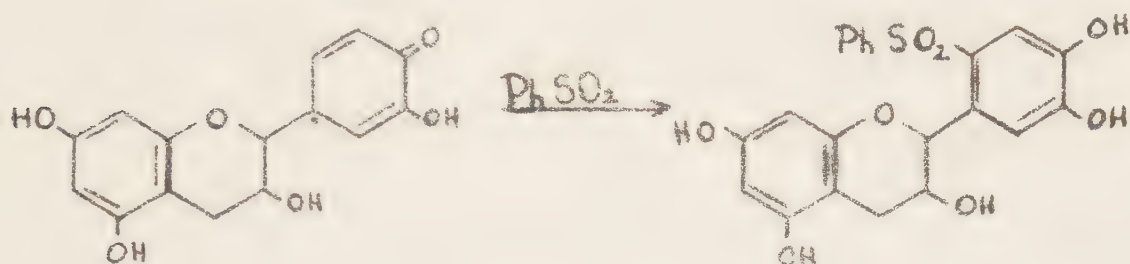
semble, aujourd'hui, la meilleure théorie de la condensation oxydative des phénols.

En ce qui concerne l'oxydation de la DOPA, à côté des radicaux aryloxy, des radicaux libres provenant de la chaîne latérale ont été décelés.

L'oxydation du catéchol par la tyrosinase selon FORSYTH, QUESNEL et ROBERTS pourrait débiter selon le schéma suivant (63) :



Le mécanisme d'oxydation de la catéchine implique toujours la formation d'un radical aryloxy qui peut réagir avec la catéchine pour former des polymères ou qui, en présence de benzènesulfinate produit la sulfone :



B.O. LINDGREN, au cours de l'étude de polymères provenant de l'oxydation du guaiacol, constate que les agents oxydants influent sur la nature des liaisons entre monomères -liaison C - C ou liaison éther, nous l'avons vu plus haut- et s'il n'écarte pas le rôle des radicaux aryloxy, suggère que ceux-ci forment en fait des complexes π avec les agents oxydants (67).

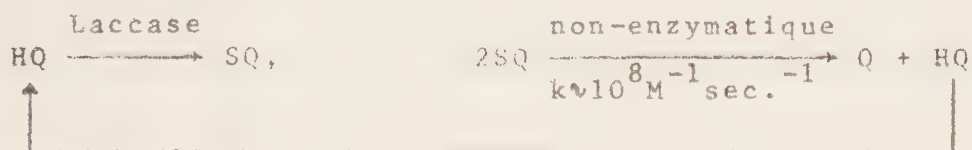
Enfin le paramagnétisme des mélanines attribué à la présence de radicaux libres insérés dans les chaînes de polymères confirme la présence de ces radicaux lors de la synthèse des pigments ; de plus, ce paramagnétisme constitue une propriété des mélanines elles-mêmes puisque l'intensité de la pigmentation est directement liée à l'intensité des signaux E.S.R. (68) perçus.

Précisons pour trois phénols qui présentent leurs groupements hydroxylés en para, ortho et méta la nature des premiers intermédiaires.

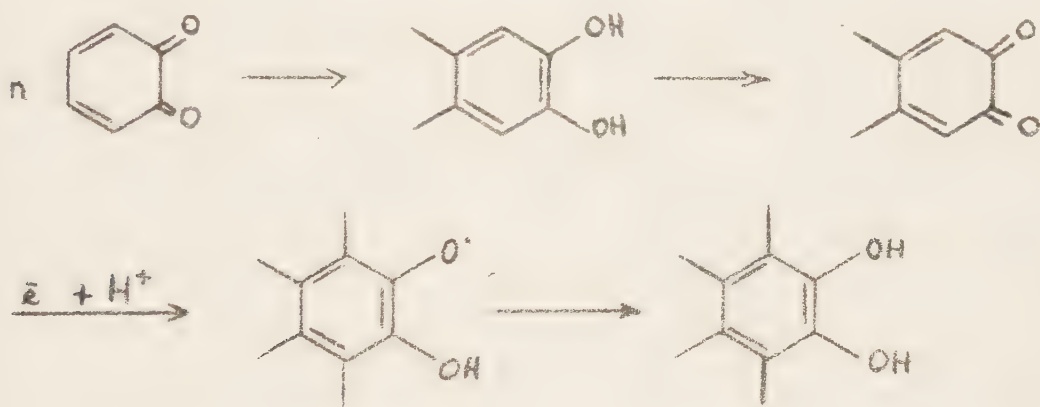
Hydroquinone : le premier produit est la semiquinone relativement stable ; le potentiel d'oxydoréduction nécessaire pour arracher le deuxième électron est si peu élevé que les quinones sont formées rapidement quand l'agent oxydant est en quantité suffisante ; celles-ci peuvent réagir avec des attaquants nucléophiles comme l'anion hydroxyle, des amines ou des ions phénolates pour former des hydroxyquinones, des aminoqui-

...

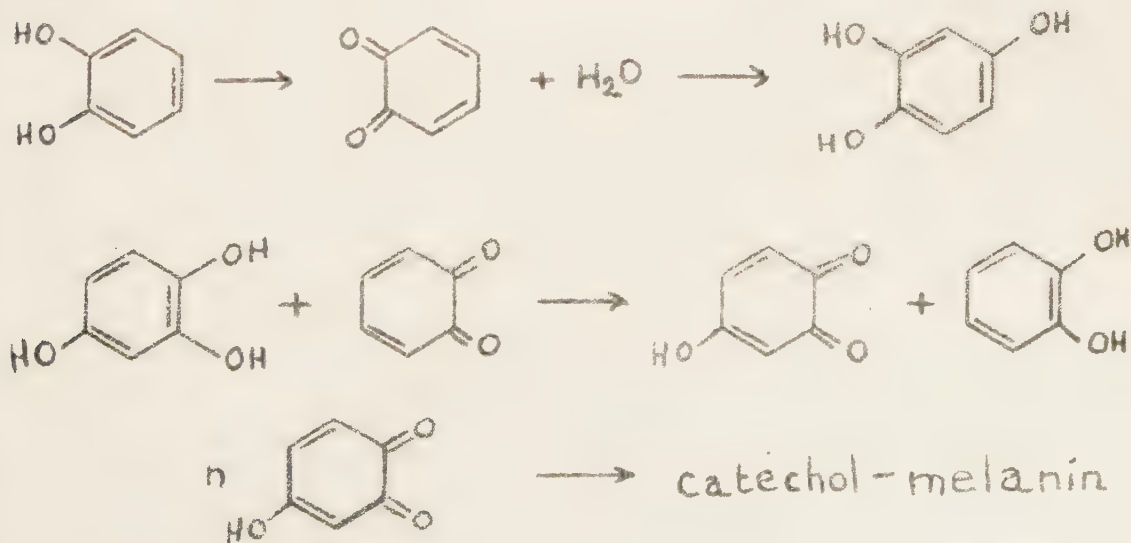
nones ou des produits polymérisés semblables à l'acide humique (69). NAKAMURA (70) a montré plus précisément que l'oxydation de l'hydroquinone par la laccase se faisait suivant le schéma suivant :



Le catéchol : il est oxydé en o. quinone ; mais les produits d'oxydation sont beaucoup moins stables que les isomères para. MASON (71) propose le schéma suivant pour la formation de "catéchol mélanines" :



DAWSON et TARPLEY (72) font intervenir l'hydroxyhydroquinone et l'hydroquinone :



Dans le cas du résorcinol, enlever un second électron nécessite un potentiel élevé et la formation de m. quinone est impossible : dans les mécanismes de polymérisation, nous retrouvons l'hydroxyhydroquinone et l'hydroquinone.

Les réactions d'addition entre quinones et attaquants nucléophiles -que nous avons déjà notées- outre les groupements hydroxyles, intéressent dans la biosynthèse des mélanines surtout les groupements aminés (73) (74) et thiols (75) des acides aminés, qu'il s'agisse de condensation avec des o. quinones (76) ou des p. quinones (77).

EXPERIENCES PERSONNELLES

I MATERIEL ET METHODES

A Souches étudiées :

De nombreuses bactéries avaient été isolées pour leur aptitude à brunir des milieux aux extraits végétaux (78). (12) nous n'avons pu en étudier rapidement que quelques-unes et une seule en détail identifiée comme une souche de Pseudomonas acidovorans.

Il s'agit essentiellement de nombreuses souches Gram -, pigmentées en rouge, orange ou jaune dont l'identification se poursuit (elles sont désignées sous les numéros 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 19, 20, 22, 23, 42, 44, 45, 46, 48 et 52) : des souches d'Achromobacter (A₁) de Micrococcus (M₁ et M₂) de Pseudomonas (P₁ et P₂) ont déjà été reconnues.

B Milieux de culture :

1. Solides :

1,1

glucose 2,5 g
peptone 5 g
extrait de levure 3 g
tampon phosphate 0,02 M
gélose 15 g
eau distillée 1000 ml.
Le pH est ajusté à 6,8.

1,2

sulfate de magnésium 0,66 g
chlorure de potassium 0,66 g
glucose 13 g
asparagine 1,3 g

tampon phosphate 0,02 M
sulfate ferreux 0,13 mg
sulfate de manganèse 0,13 mg
sulfate cuivrique 2 mg
gélose 12 g
eau distillée 1000 ml.
Le pH est ajusté à 6,8.

2. Liquides :

Nous avons préféré aux milieux solides, commodes pour effectuer des analyses rapides sur un grand nombre de souches, des milieux liquides, indispensables pour l'analyse des mécanismes enzymatiques.

Nous effectuons d'abord des essais préliminaires pour connaître les conditions de milieu favorables à l'oxydation en milieu liquide de manière à déterminer l'influence des facteurs ci-dessous :

- source de carbone : glucose ou mannitol
- source d'azote : asparagine ou peptone
- rapport carbone/azote de 5, 10 et 15
- présence ou absence d'un inducteur le catéchol
 $4 \times 10^{-3}M$ à $5 \times 10^{-5}M$
- présence de tampon phosphate 0,02 M
(sulfate de magnésium, chlorure de potassium et des sels de fer, de manganèse et de cuivre étaient toujours présents). Ces cultures ont été faites en milieux agités ou stationnaires.

Les filtrats de ces cultures ne se sont jamais montrés capables d'oxyder le catéchol, quelle que soit sa concentration, en un produit brun noir.

Cependant, le milieu ci-dessous, particulièrement favorable à la croissance des microorganismes et à la stabilité du pH initial, est adopté, à la suite de ces essais préliminaires. Nous l'appelons milieu de base mannitol-asparagine (MAE).

chlorure de potassium 0,27 g
sulfate de magnésium 0,27 g

mannitol 2,7 g
asparagine 0,66 g
phosphate monopotassique 2,72 g
phosphate bipotassique 3,48 g
sulfate ferreux 0,13 mg
sulfate de manganèse 0,13 mg
sulfate cuivrique 2,6 mg
eau distillée 1000 ml.

Le milieu est ajusté à pH 6,8, réparti dans des erlens de 250 cm³ à raison de 100 cm³ par erlen : les cultures sont conduites à 30°C, elles sont agitées (vitesse de 200 tours par minute, excentricité de 5 cm).

3. Méthode de transfert :

Après 24 heures d'incubation sur MAB, les cultures sont centrifugées aseptiquement (20000 g pendant 10 minutes à + 7°C). Les culots obtenus sont aussitôt mis en suspension dans le milieu suivant

chlorure de potassium 0,27 g
sulfate de magnésium 0,27 g
sulfate ferreux 0,13 mg
sulfate de manganèse 0,13 mg
sulfate cuivrique 2,60 mg
tampon phosphate 0,02 M
eau distillée 1000 ml.

Le pH est ajusté à 6,8.

Nous l'appelons milieu de transfert de base (TB).

Nous lui ajoutons les différents phénols (la concentration finale dans les suspensions bactériennes est de 4×10^{-3} M).

Les témoins sont constitués de cultures bactériennes qui ont subi un chauffage à 100°C pendant 4 minutes puis qui ont été mises en suspension, après centrifugation, dans le milieu ci-dessus.

C Préparation d'extraits bruts acellulaires :

Les culots de centrifugation, obtenus dans les mêmes conditions que précédemment sont lavés dans un tampon phosphate pH 6,8. Nous centrifugeons à nouveau. Les culots obtenus sont mis en suspension dans ce même tampon phosphate additionné de KCl à 1,15 % à raison d'environ 30 mg de bactéries par ml de tampon. Cette suspension est soumise aux Ultra Sons à l'aide d'un appareil ANNEMASSE 150 T.

Ce traitement est effectué dans la glace fondante.

Une dernière centrifugation pendant 10 minutes à 20000 g toujours à + 7°C permet d'écarter débris cellulaires et cellules intactes et de recueillir un extrait brut acellulaire.

Détermination de la concentration en protéines de l'extrait brut acellulaire :

La teneur en protéines de l'extrait est mesurée par la méthode du Biuret. La courbe d'étalonnage a été établie en préparant les solutions suivantes d'albumine humaine à partir d'une solution à 8 g pour 100 ml (GORNALL, BARDAWILL et DAVID (79)) : tableau page 30.

Nous laissons incuber 30 minutes et nous lisons la Densité Optique à 540 mμ (figure 1).

En général, 1,5 g de cellules humides fournissent une solution protéique à la concentration de 4 mg par ml.

D Mise en évidence des activités enzymatiques :

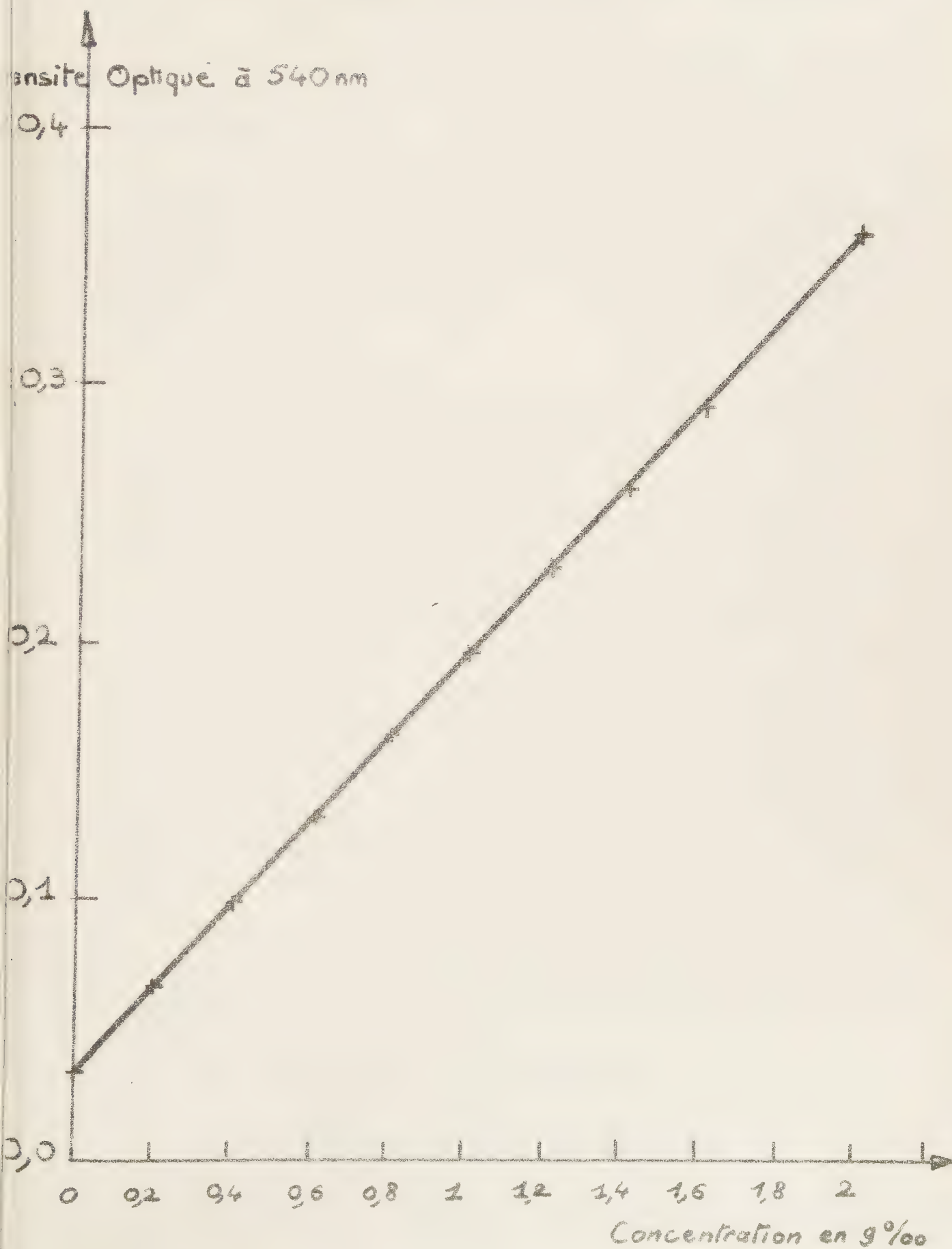
Les substrats utilisés comme les produits formés possédant des spectres U.V. caractéristiques, la spectrophotométrie, qui est d'ailleurs généralement utilisée, convient parfaitement.

Nous employons un spectrophotomètre SAFAS 1800 double faisceau.

Les mesures sont faites sur des filtrats de culture ou des extraits bruts acellulaires convenablement dilués.

Solution	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6	n° 7	n° 8	n° 9	n° 10	n° 11
Albumine humaine											
2 g/100 (ml)	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extrait physiologique											
(2 g/100) ml	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Biuret en ml	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Concentration en albumine hum.											
(g/100)	10	9.2	8.4	7.6	6.8	6	5.2	4.4	3.6	2.8	2

Figure 1

Courbe d'étalonnage

II RESULTATS

I Sur milieux solides, expériences préliminaires.

1. Vingt-cinq souches bactériennes sont cultivées en boîtes de Pétri sur le milieu 11 ; elles ont été ensemencées dans la masse.

Après 45 heures d'incubation, nous déposons sur ces cultures des disques de gélose qui contiennent différents phénols (catéchol, résorcinol, hydroquinone, p. crésol, phloroglucinol, guaiacol, acide protocatéchique, acide vanillique, tyrosine) à la concentration 0.1 M en même temps que sur le milieu de culture non ensemencé : ces dernières boîtes nous servent de témoins.

Nous vérifions, au papier indicateur que le pH des cultures reste voisin de 6,8 ; des mesures effectuées plus tard sur quelques souches seulement, en utilisant un pH mètre et une électrode à extrémité active plane ont confirmé ces premiers résultats. Trois heures après la pose de ces disques, des anneaux brun-noir se développent autour des disques de catéchol et d'hydroquinone pour la quasi totalité des souches étudiées ; il faut attendre 12 heures pour noter l'apparition d'une teinte brun-jaune autour des disques de phloroglucinol ; cependant la différence de teinte entre témoin et culture n'est pas assez nette pour que nous puissions la prendre en considération, il en est de même pour l'acide protocatéchique. Nous remarquons que 24 heures après la pose des disques une des seules souches à n'avoir fait montre d'aucune activité (souche n° 44) provoque un brunissement rapide et intense autour des disques de catéchol et d'hydroquinone (cf tableau I).

2. Une expérience analogue mais conduite sur le milieu 12, n'avait donné aucun résultat positif, le pH de la presque totalité des cultures s'était abaissé aux environs de 4

II Cultures sur milieux liquides :

A. Nature enzymatique des réactions.

Dans les expériences sur culots (méthode de transfert)

Groupes bactériennes	catéchol	résorcinol	hydroquinone	picrésol	Phénols phloroglucinol	guaiacol	a. proto- catéchi- que	a. vanil- lique	tyrosine
1	+	0	+	0	0	0	0	0	0
2	+	0	+	0	0	0	0	0	0
3	+	0	+	0	0	0	0	0	0
7	+	0	+	0	0	0	0	0	0
8	+	0	+	0	0	0	0	0	0
9	+	0	+	0	0	0	0	0	0
10	+	0	+	0	0	0	0	0	0
11	+	0	+	0	0	0	0	0	0
12	+	0	+	0	0	0	0	0	0
13	+	0	+	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	+	0	+	0	0	0	0	0	0
16	+	0	+	0	0	0	0	0	0
17	+	0	+	0	0	0	0	0	0
18	+	0	+	0	0	0	0	0	0

TABLEAU I (suite)

Souces bacté- riennes n°	catéchol	résoresci- nol	hydro- quinone	puerésol	phénols chloro- glucinol	guaiacol	a. proto- catéchi- que	a. vanil- lique	tyrosine
42	+	0	0	0	0	0	0	0	0
44	+	0	+	0	0	0	0	0	0
45	+	0	+	0	0	0	0	0	0
46	+	0	+	0	0	0	0	0	0
47	+	0	+	0	0	0	0	0	0
52	+	0	+	0	0	0	0	0	0
A ₁	+	0	+	0	0	0	0	0	0
P	+	0	+	0	0	0	0	0	0
M ₁	+	0	+	0	0	0	0	0	0
M ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₁	+	0	+	0	0	0	0	0	0
P ₂	+	0	+	0	0	0	0	0	0

K P. acidovorans

et sur cultures, les témoins ne présentent aucun changement de couleur net ; si cultures entières et culots traités par la chaleur se colorent très légèrement en rose après l'addition de catéchol et incubation c'est le fait de l'autoxydation du catéchol.

C'est bien à une réaction enzymatique d'oxydation du catéchol que nous avons affaire ; si les témoins bouillis brunissaient aussi, ce pourrait être par exemple, l'indice d'une réaction de type Maillard (80).

Ajoutons que si dans le compte rendu de notre stage de laboratoire (81) nous avons étudié les propriétés des filtrats de culture de Micrococcus 1 et si nous avons conclu à l'existence d'un système enzymatique extracellulaire capable de transformer en composés bruns catéchol et acide protocatéchique, il nous faut préciser que cette activité oxydase était des plus faibles comparée à celle que nous étudions ici :

Soit ST la diminution de la transmission mesurée à 450 mμ après 40 minutes d'incubation avec le catéchol : seule la différence $\Delta T = ST - ST \text{ témoin}$ est significative puisqu'il existe une autoxydation du catéchol à pH 6,3, pH auquel sont effectuées ces expériences.

Or avec les filtrats de culture de Micrococcus 1, nous avons des ΔT voisins de 1 %. ici, en faisant agir du catéchol sur des cultures non adaptées ou sur des culots, les ΔT sont toujours supérieurs à 30 %.

B. Substrats des réactions enzymatiques de brunissement.

Nous utilisons la méthode de transfert pour l'étude de l'oxydation du catéchol, de l'hydroquinone, de l'acide protocatéchique et du phloroglucinol par 7 souches bactériennes. Les suspensions bactériennes sont laissées immobiles pendant l'incubation avec le substrat phénolique dont la concentration est $4 \cdot 10^{-3} M$.

Les résultats sont présentés dans le tableau II :

Souches	A ₁	P. aci- dovo- rans	M ₂	P ₁	P ₂	7	13
catéchol	+(+)	+(+)	0(0)	+(+)	+(+)	0(+)	+(+)
hydro- quinone	(+)	+(+)	0(0)	+(+)	(+)	+(+)	+(+)
a. proto- catéchi- que	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(0)	(0)
phloro- glucinol	(0)	0(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

TABLEAU II

Le signe +, pour le catéchol, signifie que la culture toute entière est devenue brun noire en 20 minutes (après quelques minutes d'incubation, les suspensions deviennent jaunâtres puis jaune vert avant de virer au brun), pour l'hydroquinone rose mauve à brun rouge en 40 minutes alors que les témoins restent incolores ; le signe 0 traduit l'absence de tout changement de couleur. Nous vérifions encore que les filtrats ne présentent aucune activité envers ces phénols.

-Les résultats entre parenthèses sont ceux trouvés lors de cultures sur milieu gélosé glucose-pentone-.

Résultats obtenus en milieux solides et liquides concordent. Remarquons cependant que les réactions sont beaucoup plus rapides en milieu liquide et, de ce fait, ne laissent pas subsister de doute puisque l'autoxydation n'intervient pas.

Le brunissement n'a lieu ni en présence des monophénols ni en présence de diphénols ayant leurs groupements hydroxylés en méta ; il se produit uniquement avec un p. diphénol et un o. diphénol.

Nous avons poursuivi avec la seule souche P. acidovorans et le catéchol nos expériences avec les culots de cen-

trifugation pour préciser le rôle de cette méthode de transfert :

Les cellules obtenues par centrifugation, dans les conditions décrites plus haut sont mises en suspension dans différents milieux laissés immobiles à la température du laboratoire.

1. Le culot est remis en suspension dans le surnageant auquel on a ajouté du catéchol $410^{-3}M$ on n'observe aucun brunissement.

(L'addition de catéchol $410^{-3}M$ à des cultures, après 24 heures d'incubation, cultures qui sont alors laissées immobiles ne provoque pas non plus de brunissement).

2. Milieu TB : après 4 heures et 12 heures d'incubation, les filtrats n'ont aucune action sur le catéchol $410^{-3}M$ (milieu TB + catéchol $410^{-3}M$ il y a noircissement rapide du milieu et pigmentation des cellules en noir -comme nous l'avons déjà vu-).

3. Milieu MAB sans le mannitol + catéchol $410^{-3}M$, c'est-à-dire milieu TB + asparagine ; pas de brunissement, il y a consommation du catéchol, nous remarquons que la phase de latence dans l'utilisation du catéchol est très réduite ici.

4. Milieu MAB + catéchol $410^{-3}M$, on n'observe aucun brunissement, les spectres U.V. montrent que le catéchol est consommé.

Ces résultats, que nous avons résumés dans le tableau II b, montrent que le traitement infligé, centrifugation et mise en suspension, c'est-à-dire le transfert, n'est pas en cause dans la réaction de brunissement, la composition du milieu dans lequel sont transférées les cellules intervient seule.

L'apport d'asparagine dans le milieu de transfert TB permet l'utilisation du catéchol ; il n'y a pas brunissement.

TABLEAU II F

Culots mis en suspension	Observations
dans les milieux suivants	
laissés immobiles	
Surnageant + catéchol $410^{-3}M$	aucun brunissement
TB	les filtrats n'ont aucune action sur le catéchol $410^{-3}M$
TB + catéchol $410^{-3}M$	brunissement
TB + asparagine + catéchol $410^{-3}M$	pas de brunissement utilisation immédiate du catéchol
MAB + catéchol $410^{-3}M$	pas de brunissement utilisation du catéchol

C. Rapport C/N : compétition mannitol catéchol :

Des cultures sont conduites sur deux milieux :

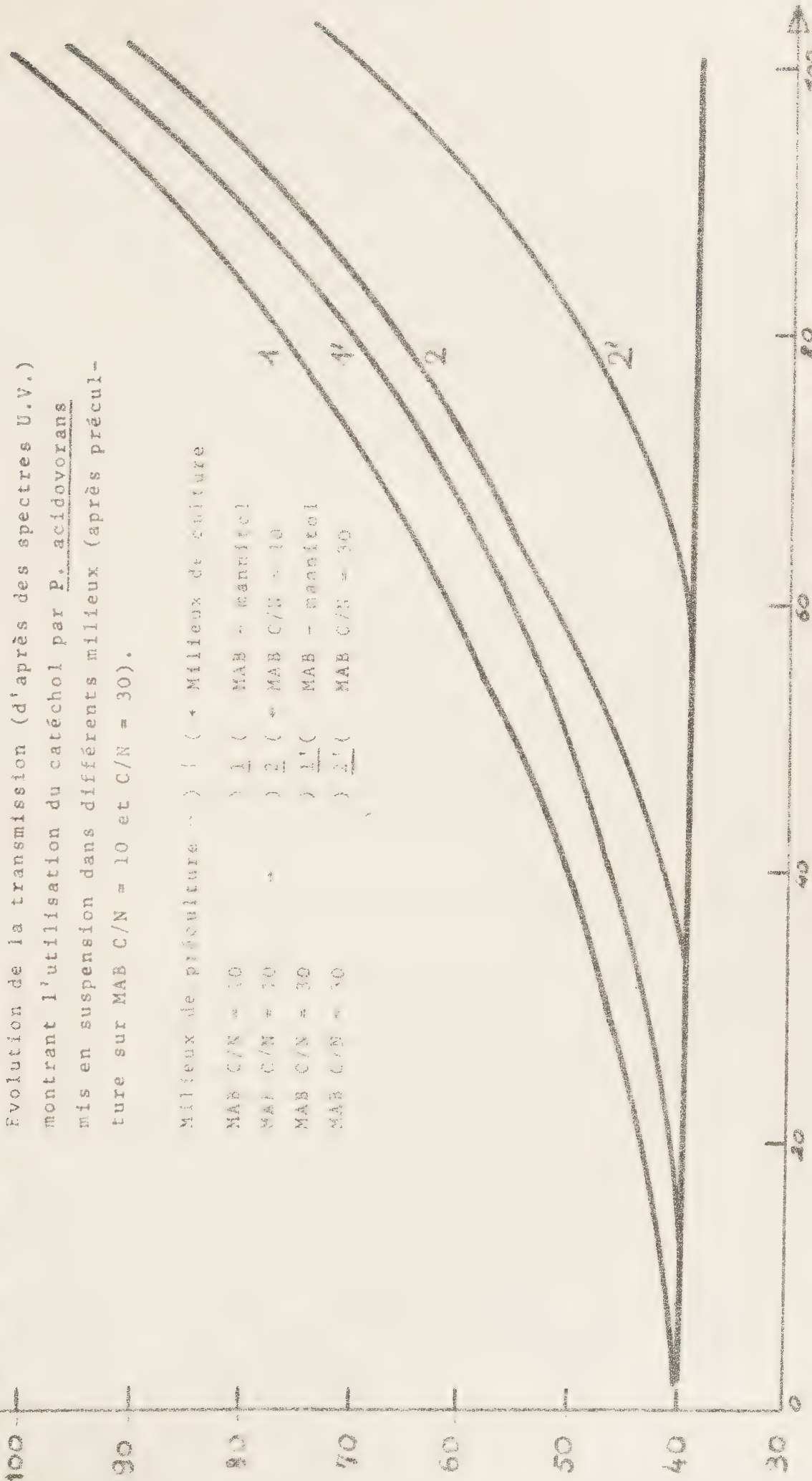
- le milieu de culture de base MAB, rapport C/N = 10.
- un milieu qui diffère du MAB seulement par les quantités de mannitol, 10 g/l. rapport C/N = 30.

Les cultures sont agitées, à la température du laboratoire, 22°C environ.

Après 20 heures d'incubation :

1. Les deux séries sont centrifugées, les culots mis en suspension :

Transmission à 276 nm



Evolution de la transmission (d'après des spectres U.V.) montrant l'utilisation du catéchol par P. acidovorans mis en suspension dans différents milieux (après préculture sur MAB C/N = 10 et C/N = 30).

Milieux de préculture : (+ Milieux de culture

- MAB C/N = 10) 1 (MAB - mannitol
- MAB C/N = 10) 2 (+ MAB C/N = 10
- MAB C/N = 30) 1' (MAB - mannitol
- MAB C/N = 30) 2' (MAB C/N = 30

(après mise en suspension des colots dans différents milieux)

- a) dans le milieu TB + catéchol $410^{-3}M$: rapidement le milieu devient brun noir, les cellules sont pigmentées en noir.
- b) dans le milieu de culture neuf sans mannitol + catéchol $410^{-3}M$, le catéchol est utilisé.
- c) dans le milieu de culture neuf + catéchol $410^{-3}M$ le catéchol est utilisé.

Les cultures sont laissées immobiles.

Ces résultats sont les mêmes pour les deux séries. Soulignons cependant que dans les deux derniers milieux, la consommation du catéchol débute plus rapidement dans la série C/N = 10 (voir figure 2).

2. Du catéchol $410^{-3}M$ est ajouté aux deux séries de cultures qui sont alors laissées immobiles :

- C/N = 9 : au bout de 4 heures, le milieu devient brun noir, les cellules sont pigmentées en noir.
- C/N = 30 : ni brunissement, ni consommation de catéchol ne sont décelés après 48 heures d'incubation.

Dans le milieu de base MAB, le mannitol est le facteur limitant ; quand il n'en est pas ainsi (C/N = 30) le catéchol est utilisé moins rapidement ou n'est même pas utilisé du tout.

2. Influence de la température et de l'agitation :

Des cultures de P. acidovorans sur le milieu de base MAB sont conduites à deux températures : température du laboratoire environ $22^{\circ}C$ et à $30^{\circ}C$, elles sont agitées.

Après addition de catéchol $410^{-3}M$ dans les cultures à différents moments de leur croissance, celles-ci sont laissées sur l'agitateur ou laissées immobiles.

Nous notons le début de la réaction de brunissement, l'apparition de la teinte jaune vert (tableau III) :

- cultures agitées : le temps de réponse passe par un maximum correspondant à la phase stationnaire.
- cultures laissées immobiles : le temps de réponse est environ 3 fois plus important que pour les cultures agitées.

TABLEAU III

Temps écoulé entre l'addition du catéchol $410^{-3}M$ dans les cultures de *P. acidovorans* et l'apparition de la teinte jaune qui précède le brunissement.

Phases de la croissance	Phase exponentielle	Phase stationnaire	Phase de déclin		
Temps en heures	10	16	24	40	70
à 30°C	20mn	30mn	2 h	40mn	
Cultures agitées à θ du labo	60mn	60mn		> 3h	2 h
Cultures laissées à 30°C	60mn	2 h	∞	60mn	
immobiles après l'addition de catéchol à θ du labo	3 h	3h30		∞	24 h

En phase stationnaire de croissance, on n'observe ni brunissement, ni consommation du catéchol. Nous pouvons supposer que malgré le renouvellement rapide des protéines et de l'ARN en phase stationnaire, les cellules, sans l'apport d'acide aminé intervenant directement dans les synthèses protéiques, ne peuvent élaborer la série d'enzymes indispensables à l'utilisation du catéchol. Nous avons déjà remarqué dans le paragraphe précédent (C. 1. b)) que l'apport d'asparagine permet la consommation du catéchol.

Que les cultures soient faites à 22°C ou à 30°C, les résultats sont comparables ; le temps de réponse est environ

3 fois plus long à 22°C mais varie de la même façon qu'à 30°C.

Ces résultats peuvent expliquer le comportement différent des cultures aux rapports C/N de 10 et de 30, cultures qui avaient été laissées immobiles après l'addition de catéchol ; en effet l'addition de catéchol a lieu en phase exponentielle de croissance pour C/N = 10, en phase stationnaire pour C/N = 30.

L'aération favorise ici le brunissement ; d'autres études avec d'autres microorganismes ont montré que ce n'était pas toujours le cas.

Arthrobacter urcovorus assimile l'acide hippurique et l'acide benzoïque ; mais cultivé sous faible pression d'oxygène sur ces substrats, il élabore un pigment brun soluble (5).

Micrococcus varians n'élabore de pigment brun que lorsqu'il est en culture stationnaire (4) sur phénol.

Agrobacterium que la culture soit agitée ou non produit un pigment brun (22).

Mais pour Azotobacter chroococcum dans les cultures agitées, le maximum de brunissement se produit au sixième jour d'incubation ; dans les cultures immobiles, il ne se passe rien jusqu'au dixième jour et le noircissement final est toujours plus faible (3).

E. Concentration en phénols : préculture en présence de phénols.

1. Catéchol :

En même temps qu'est menée une culture sur le milieu de base MAB, nous cultivons P. acidovorans sur ce même milieu additionné de catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$; les cultures sont agitées à 30°C.

Après 20 heures d'incubation, nous ajoutons aux deux séries de cultures du catéchol (stérilisé par filtration sur MILLIPORE dans du tampon phosphate pH 6,8) à 4 concentrations différentes :

$4 \cdot 10^{-3} M$, $4 \cdot 10^{-4} M$, $4 \cdot 10^{-5} M$ et $4 \cdot 10^{-6} M$ (concentrations finales dans les cultures) ; les cultures sont laissées sur l'agitateur.

Il y a brunissement du milieu et pigmentation des

cellules en noir dans un seul cas, pour tous les autres, milieux et cellules deviennent blanchâtres et les spectres U.V. des filtrats de culture montrent une utilisation du catéchol. Nous rassemblons les résultats dans le tableau IV (voir spectres des figures 3 et 4).

TABLÉAU IV

Influence de la concentration sur le brunissement et l'utilisation du catéchol par P. acidovorans.

Milieu de culture	Concentrations en catéchol ajouté			
	après 20 heures d'incubation			
	$410^{-3}M$	$410^{-4}M$	$410^{-5}M$	$410^{-6}M$
MAB	Brunissement	Utilisation	Utilisation	Utilisation
MAB + catéchol $410^{-3}M$	Utilisation	Utilisation	Utilisation	Utilisation

Ces expériences montrent d'une part, l'influence de la concentration en catéchol ajouté à des cultures non adaptées, pour $410^{-3}M$, la cellule ne peut utiliser le catéchol, il y a brunissement, alors que pour $410^{-4}M$ le catéchol est consommé, d'autre part, le caractère induit des enzymes d'utilisation puisque les cellules adaptées peuvent utiliser le catéchol $410^{-3}M$.

2. Acide protocatéchique :

Après avoirensemencé P. acidovorans sur le milieu de base MAB (cultures agitées à 30°C) et après 23 heures d'incubation, nous ajoutons de l'acide protocatéchique aux cultures à 2 concentrations différentes : $410^{-2}M$ et $410^{-3}M$.

Transmission

Figure 3

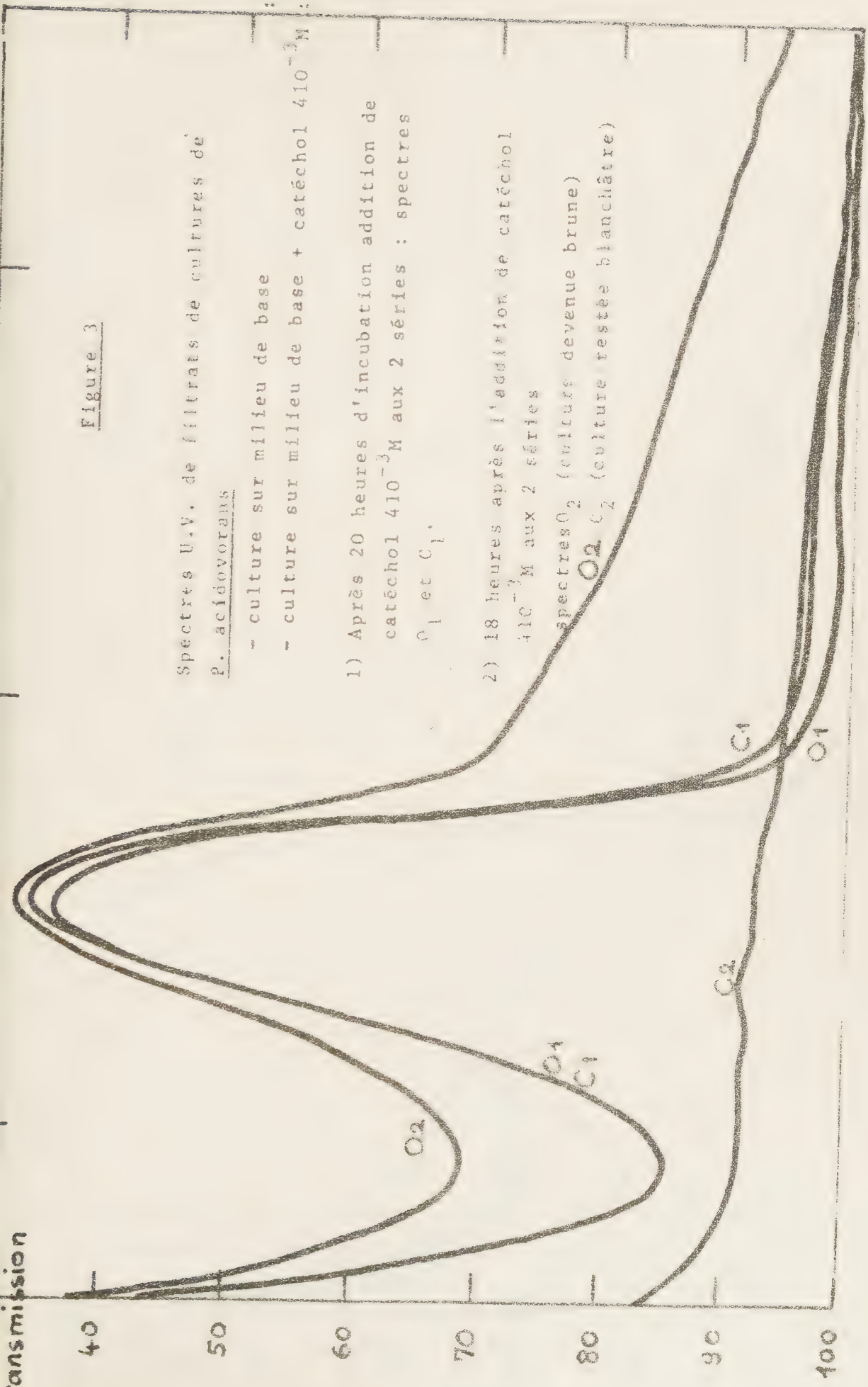
Spectres U.V. de filtrats de cultures de
P. acidovorans

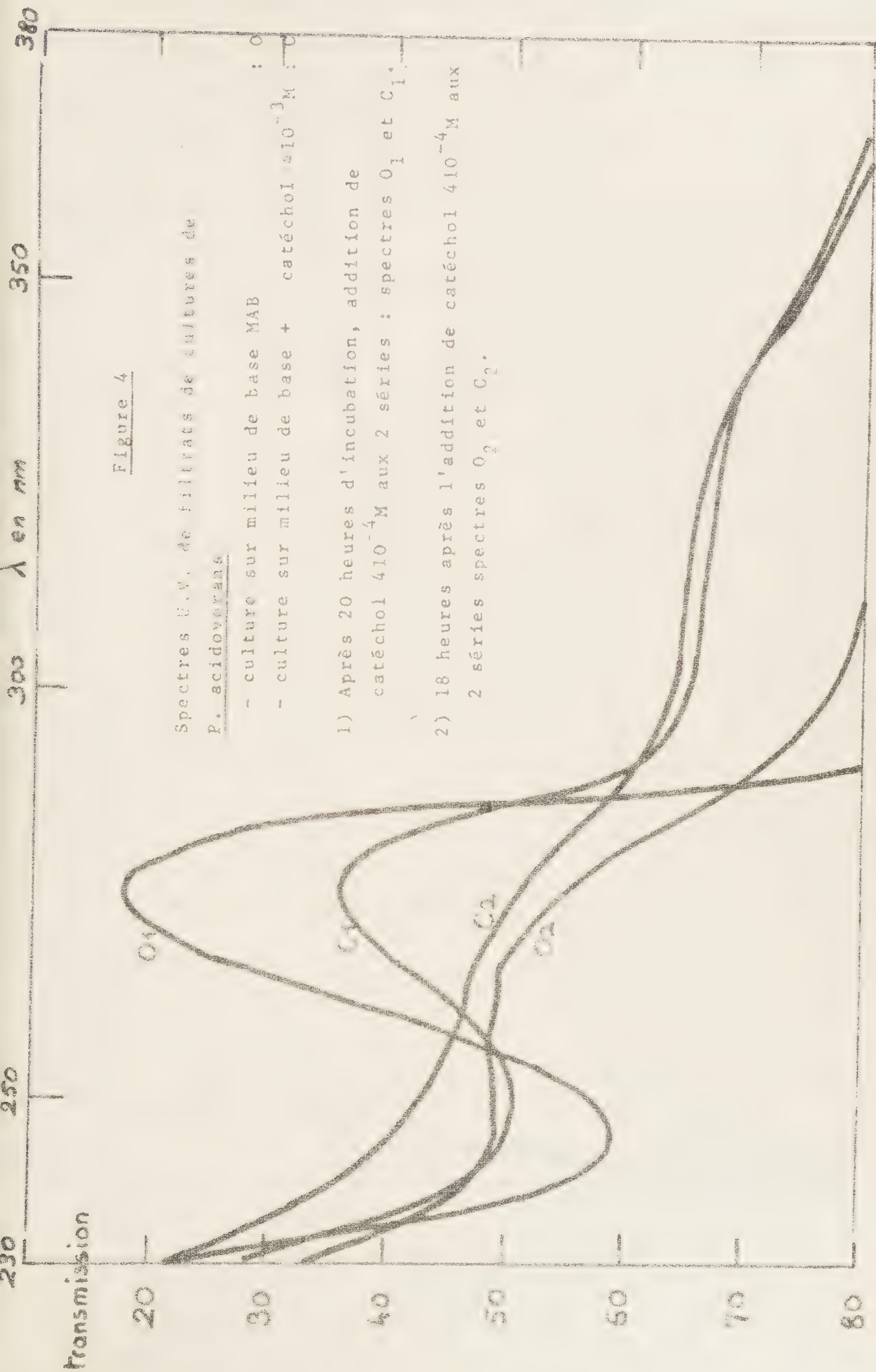
- culture sur milieu de base
- culture sur milieu de base + catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$: C

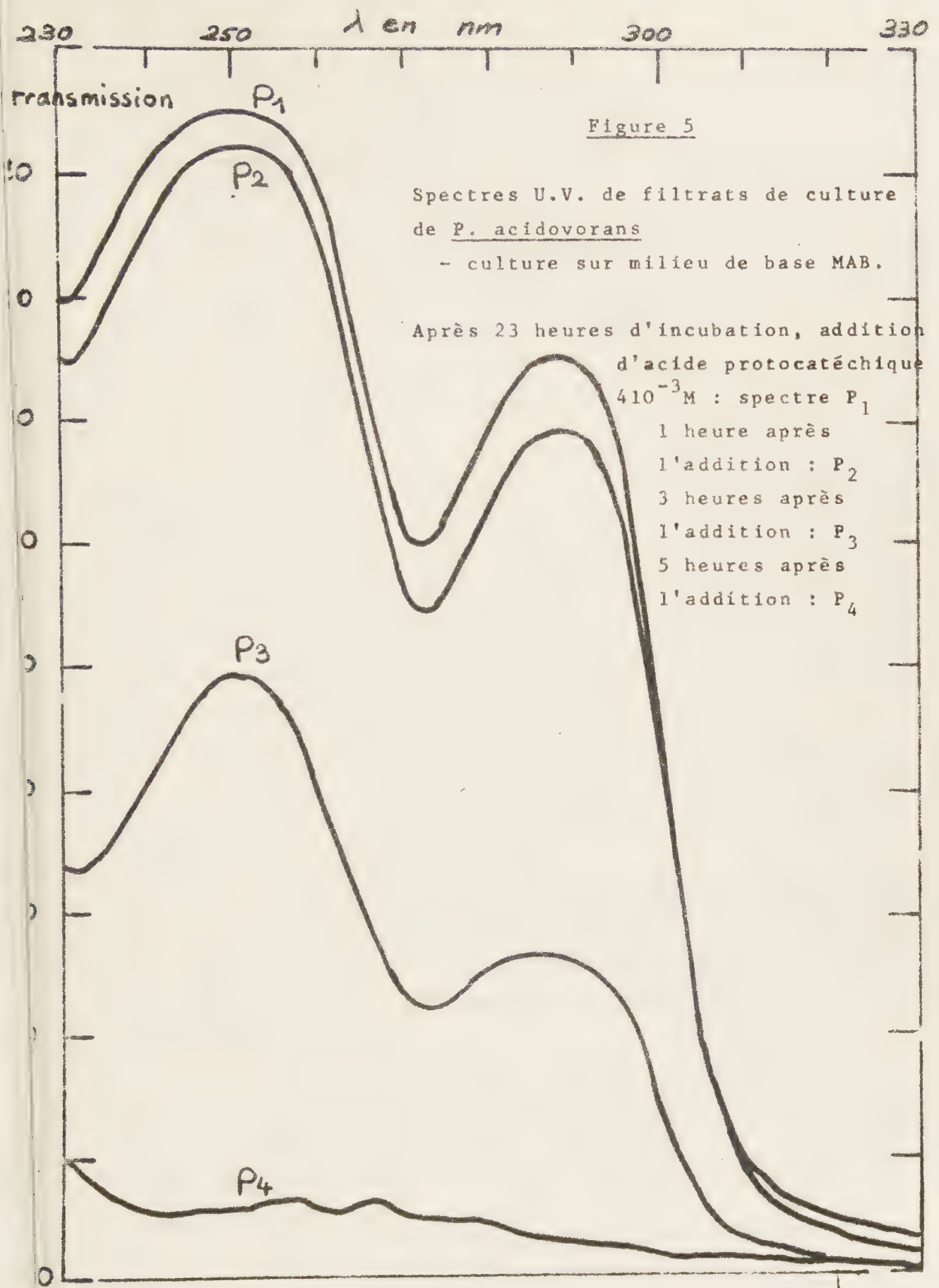
1) Après 20 heures d'incubation addition de
catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$ aux 2 séries : spectres
 O_1 et C_1 .

2) 18 heures après l'addition de catéchol
 $4 \cdot 10^{-3} M$ aux 2 séries

spectres O_2 (culture devenue brune)
 O_2 C_2 (culture restée blanchâtre)







Pour $410^{-2}M$, une teinte brun-jaune se développe dans les cultures, les cellules sont pigmentées en brun, il n'y a pas consommation du substrat phénolique tandis que pour $410^{-3}M$ les spectres U.V. (figure 5) montrent une utilisation de l'acide protocatéchique, la culture demeure blanchâtre.

Remarquons que, dans ce dernier cas, quelques cellules pigmentées en noir sont apparues comme après addition de catéchol $410^{-4}M$ à des cellules non adaptées.

F. Toxicité du catéchol :

Les spectres U.V. des filtrats de cultures de P. acidovorans effectuées sur milieu de base MAB plus catéchol $410^{-3}M$ enseignent que la consommation du catéchol ne débute qu'après une longue phase de latence de 16 heures environ (figure 6) et avec cette concentration de catéchol la croissance est plus lente. La toxicité du catéchol est connue, très peu de bactéries -des souches d'Arthrobacter ruber par exemple (5)- sont capables de l'utiliser comme seule source de carbone pour leur croissance sur un milieu synthétique.

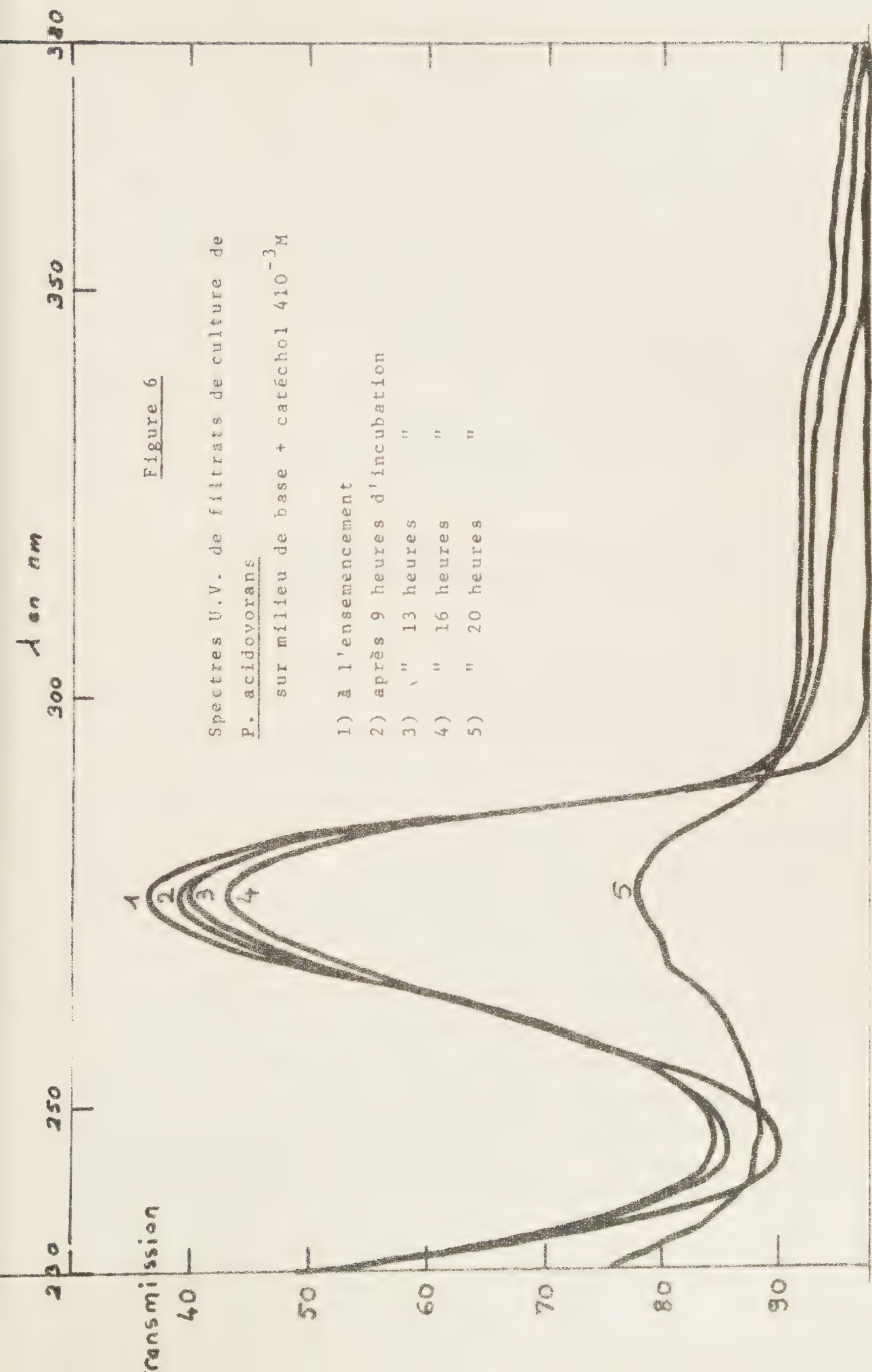
En revanche notre souche de P. acidovorans est capable d'utiliser l'acide protocatéchique comme seule source de carbone (dans le milieu de base, le mannitol est remplacé par l'acide protocatéchique $10^{-2}M$).

Les mesures néphélométriques montrent que l'addition de catéchol $410^{-3}M$ dans une culture sur milieu de base en phase exponentielle de croissance arrête toute prolifération. Employant la méthode classique des suspensions dilutions nous précisons ce résultat.

Avant l'addition du catéchol, nous dénombrons 10^9 cellules viables par ml de milieu. Après 4 heures d'incubation avec le catéchol, alors que le milieu est devenu brun noir et que les cellules sont pigmentées en noir, nous ne trouvons plus une cellule viable.

Il y a donc brunissement et mort des cellules.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de SUNDMAN, SEDERHOLM et HARO qui ont étudié l'activité d'une souche d'Agrobacterium sur la methoxy p. benzohydroquinone (83) ; de faibles quantités de methoxy p. benzohydroquinone stimulent la



consommation d'O₂ d'Agrobacterium (lavé 3 fois puis mis en suspension dans un tampon phosphate, des quantités plus importantes (1 - 2,5 μ moles) la diminuent, des quantités encore plus importantes accroissent la consommation d'O₂ ; dans ce dernier cas, inhibition de la respiration et oxydation du composé inhibiteur (1 atome d'O₂ par molécule) interviennent simultanément ce qui est mis en évidence par une diminution de la production de CO₂ de 70 % pour des quantités de methoxy p. benzohydroquinone supérieures ou égales à 1 μ mole (1 μ mole correspond ici à une concentration de $7 \cdot 10^{-4}$ M). Les mêmes essais, effectués sur E. coli et Bacillus megaterium n'ont montré aucun effet semblable. Dans ces conditions d'inhibition de la respiration, l'oxydation de la methoxy p. benzohydroquinone par cette souche d'Agrobacterium donne naissance à des produits bruns solubles et insolubles.

G. Age des cultures, coexistence des deux voies d'oxydation, brunissement et utilisation des phénols :

Après 7 jours de culture de P. acidovorans sur le milieu de base MAB (cultures agitées à 30°C) du catéchol $4 \cdot 10^{-4}$ M ou de l'acide protocatéchique $4 \cdot 10^{-3}$ M sont ajoutés.

Après 4 heures d'incubation, les milieux de cultures deviennent brun et rouge brun respectivement.

Les spectres dans le visible montrent une diminution de la transmission à 450 m μ de 30 % environ. Des comptages (méthode des suspensions-dilutions) montrent que 54 % des cellules ont été tuées par le catéchol 13 % par l'acide protocatéchique.

Nous laissons incuber encore 8 heures, les spectres U.V. témoignent de l'utilisation des substrats phénoliques par les microorganismes, (cf spectres U.V. et dans le visible figures 7, 8, 9 et 10) ; l'effacement des pics d'absorption est net pour l'acide protocatéchique, pour le catéchol le pic d'absorption se déplace vers 2600 Å en s'estompant, le catéchol est consommé beaucoup moins rapidement que l'acide protocatéchique.

Figure 7

Spectres U.V. de filtrats de cultures (sur milieu de base MAB) de *P. acidovorans* après 7 jours d'incubation dans lesquelles du catéchol $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$: C
ou de l'acide protocatéchique $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$: P
ont été ajoutés

- après l'addition : C₁, P₁
- 12 heures après l'addition : C₂, P₂
- 40 heures après l'addition : C₃, P₃.

(Voir page 51 la figure 8 pour l'acide protocatéchique).

transmission

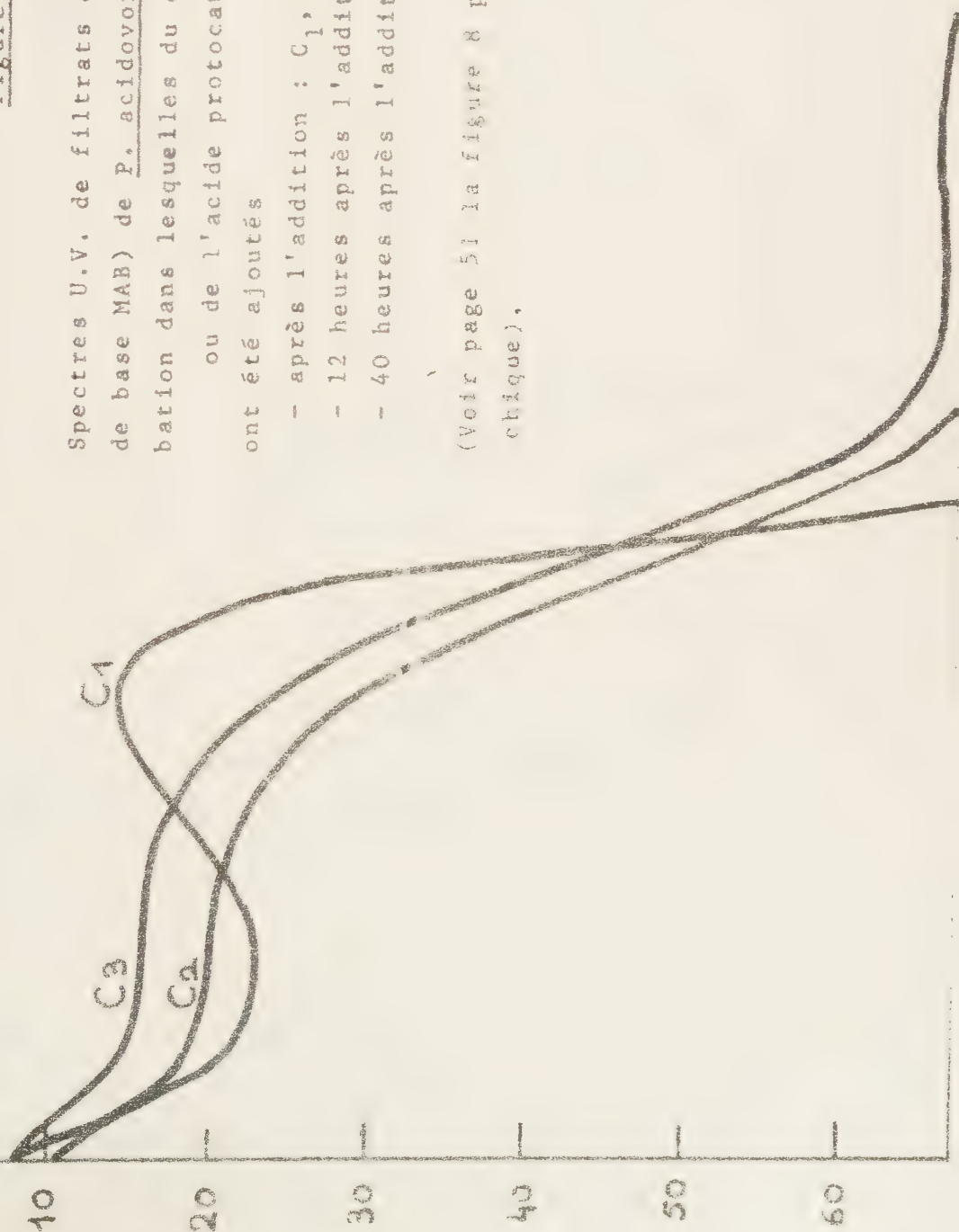
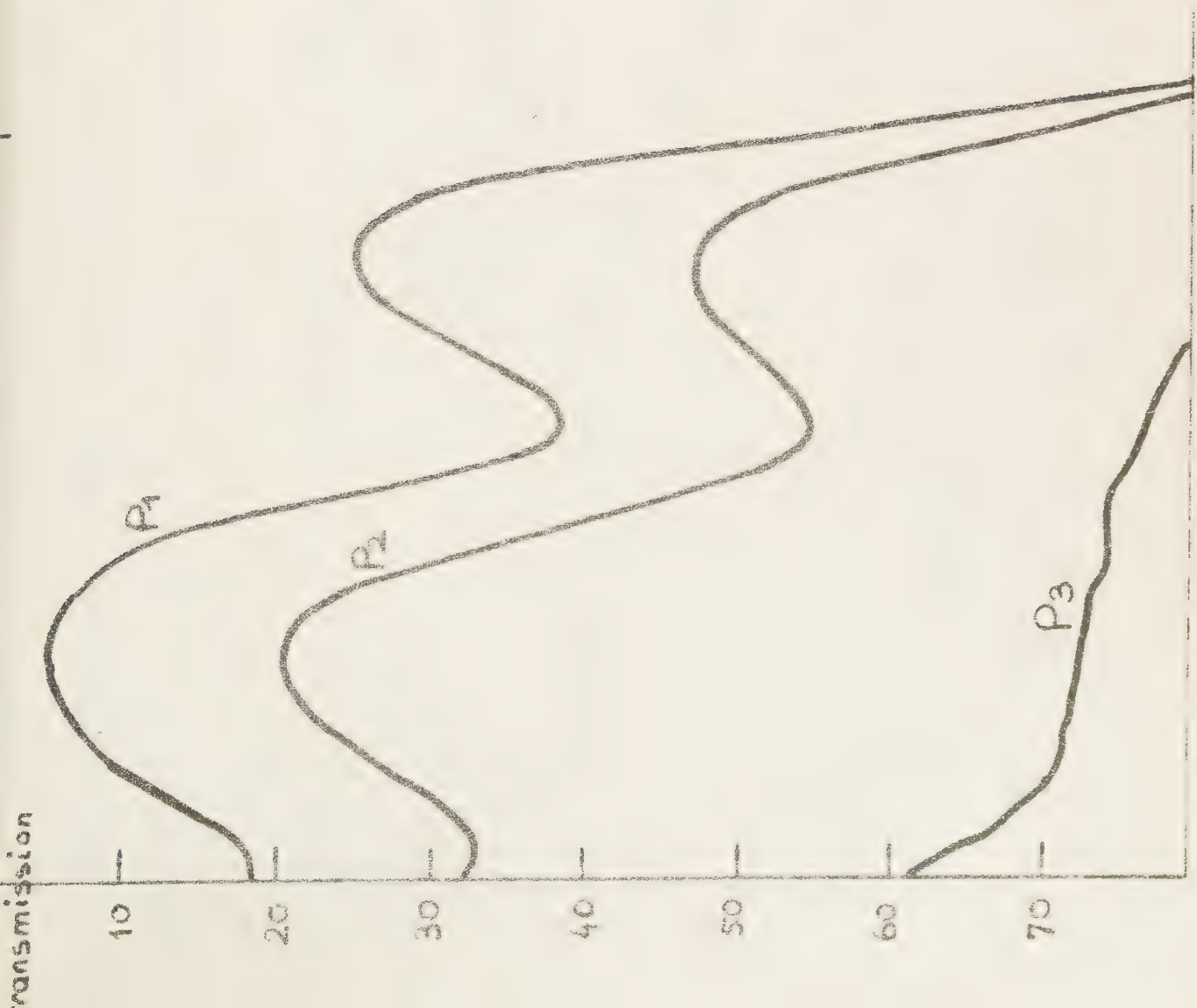
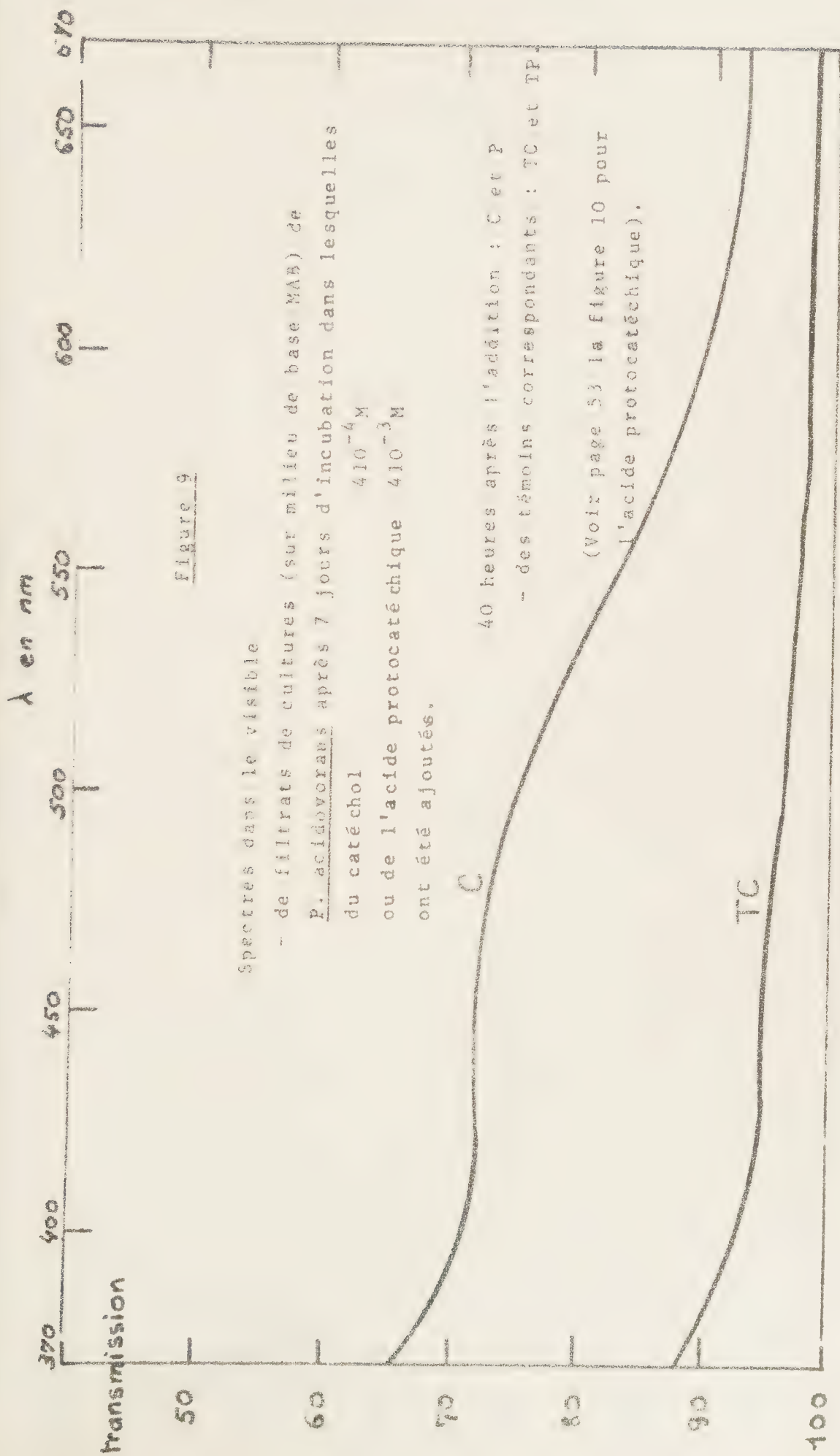
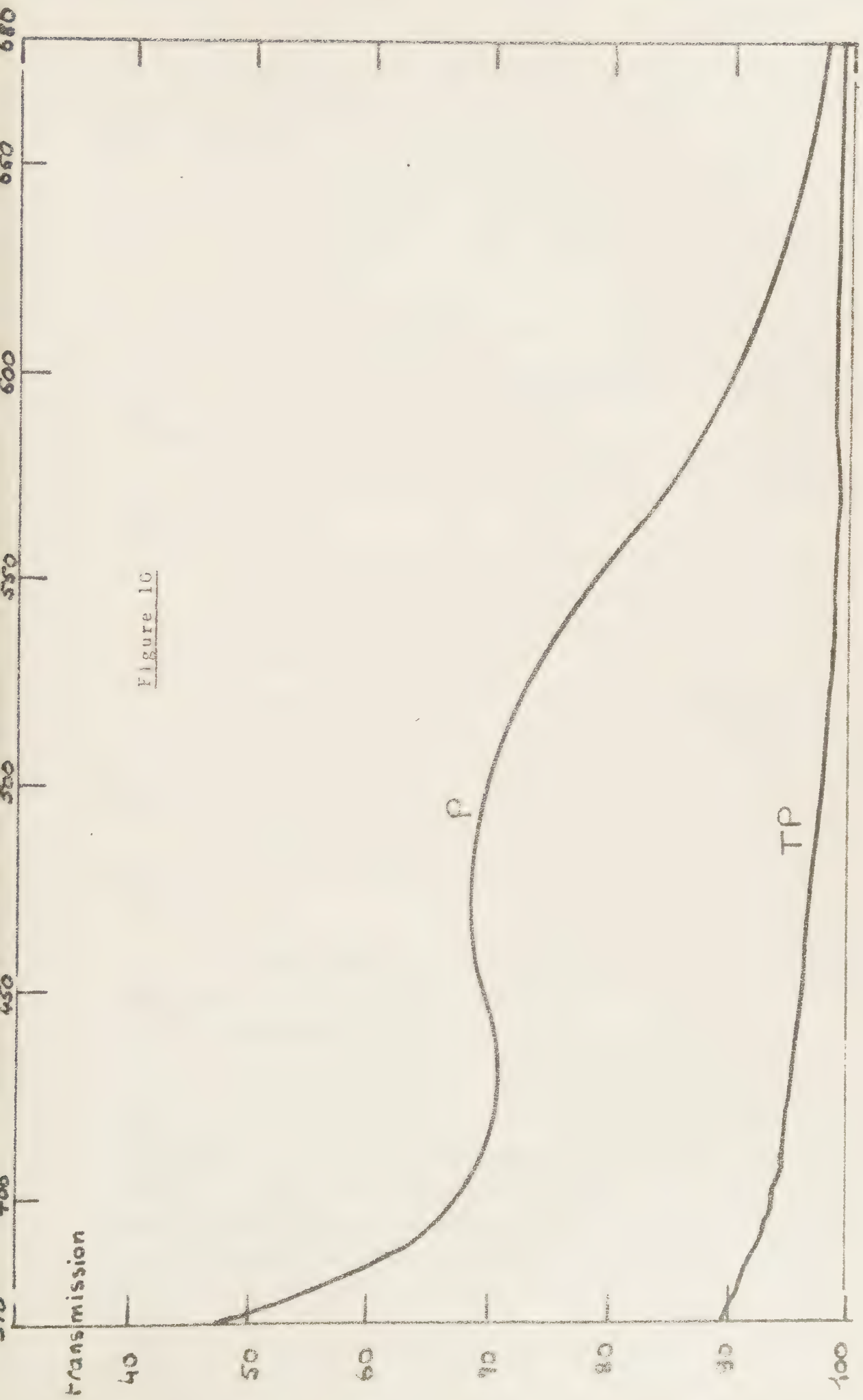


Figure 8





Les concentrations faibles en diphénols qui, dans des cultures jeunes, ne provoquaient aucun brunissement mais l'induction d'enzymes d'utilisation, ont, dans des cultures âgées, présenté deux effets nets :

1. la formation de pigments bruns
2. l'induction d'oxygénases.

Les deux voies d'oxydation des phénols coexistent ici.

Une autre expérience, sur milieu solide cette fois, montre aussi l'influence de l'âge des cultures :

Nous ensemençons P. acidovorans sur un milieu peptone-glucose gélosé dans des boîtes de Pétri : le milieu est tamponné, pH 6,8 (incubation à 30°C).

Des disques de gélose contenant du catéchol $10^{-1}M$ dans du tampon pH 6,8 sont disposés sur les cultures à différents moments :

1. au moment de l'ensemencement en masse
2. après 24 heures d'incubation
3. après 6 jours d'incubation.

Nous observons ceci :

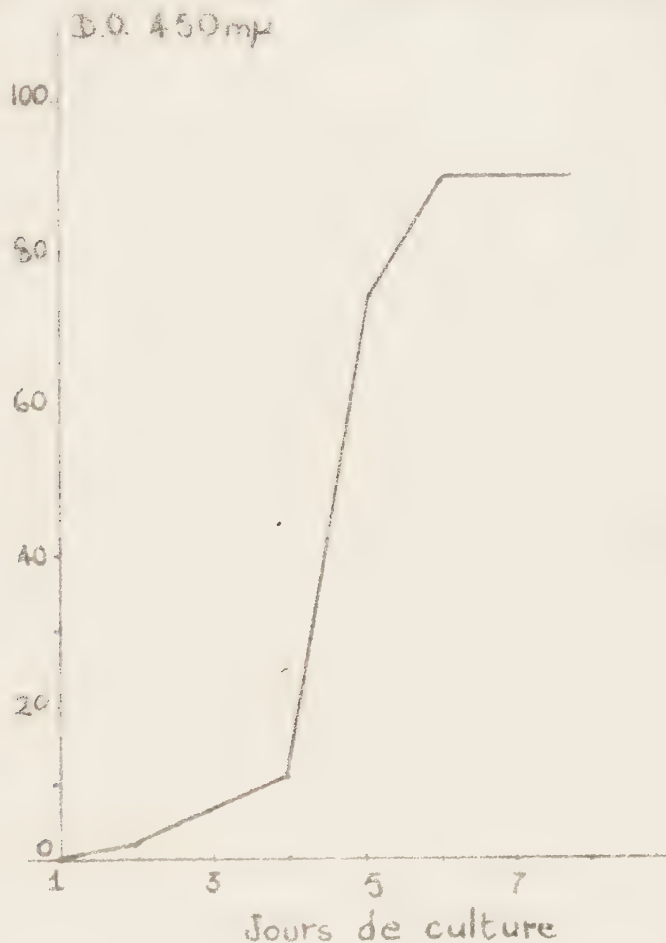
Quand le disque est mis à l'ensemencement, comme 24 heures après, il n'y a, à aucun moment, brunissement : zone d'inhibition et zone où la croissance est favorisée se succèdent quand on s'éloigne du disque de catéchol.

Après 6 jours d'incubation, une heure après la pose des disques, une coloration brune se développe autour de ceux-ci.

WINOGRADSKY en 1932 (2) isolant des microorganismes fixateurs d'azote sur des plaques au benzoate de soude identifie des Azotobacter, il écrit :

Au bout de 3 à 4 jours, ces colonies bombées, hyalines blanchissent et se figent. Le pH est 8,0. Vers le huitième ou dixième jour, les colonies deviennent brun chocolat rappelant vivement par leur aspect cette substance. En même temps, le gel autour des colonies prend une teinte fumée, noirâtre jusqu'à ce que la couche entière du gel y compris les parties libres de toutes colonies se présente noircie.

HARDISSON et POCHON (3) tracent une courbe de noircissement en fonction du temps : la formation de la substance noire par un Azotobacter chroococcum (dans une culture liquide où le benzoate est la seule source d'énergie) est lente les quatre premiers jours, augmente rapidement entre le quatrième et le cinquième jour et se stabilise ensuite.



Lors de l'isolement de souches brunissant des milieux aux extraits végétaux, l'apparition d'une auréole brune n'est notée qu'après 24 à 48 heures d'incubation ; mais, dès que la colonie commence à se développer, elle est entourée d'une zone légèrement décolorée (12).

K.T. WIERINGA (10) étudie l'influence de la composition du milieu dans la production de substances brunes par des microorganismes isolés de la tourbe et capables d'utiliser des composés aromatiques : "La production de ces substances est largement déterminée par la composition du milieu de culture ... l'addition de glucose au milieu de base (extrait de levure gélosé) ne provoque qu'une très faible production de mélanine

comparée à celle produite quand du mannitol ou du lactate de sodium sont ajoutés. L'addition de tyrosine a peu ou n'a pas d'influence sur la formation de ces substances brunes. Ces résultats concernent plusieurs souches de Streptomyces.

L'essai de 13 milieux différents dans l'étude de la synthèse de substances para humiques par A. chroococcum (3) indique que les ions Cu^{++} et Mo^{++} comme de faibles quantités de mannitol et d'extrait de levure n'ont aucune influence sur le noircissement alors que l'ion Mn^{++} le stimule ; HARDISSON et POCHON notent aussi que l'ion Ca^{++} stimule la croissance mais inhibe le processus de noircissement.

M. varians, en culture stationnaire, présente une croissance maximum pour 0,6 mg/ml de phénol alors que le maximum de pigmentation est obtenu pour une concentration de 0,4 mg/ml (4). Un Streptomyces (9) cultivé à 20°C sur un milieu au tryptophane produit davantage de pigment qu'à 28°C, température où le taux de croissance est double. Quand 24 heures d'incubation sur milieu à l'extrait de levures sont nécessaires à la production d'un pigment par un Achromobacter en présence de tryptophane, 1 heure suffit à l'élaboration de ce même pigment par le microorganisme mis en suspension dans un milieu contenant seulement des sels et l'acide aminé (84).

SUNDMAN et LAIBIA (11) font d'abord des cultures d'une centaine de souches isolées du sol sur un milieu riche avant de mettre en suspension les microorganismes dans un tampon phosphate contenant les donneurs d' H_2 pour étudier les diverses activités oxydases. 40 pour cent des souches présentent une activité catéchol oxydase (formation d'une couleur brune avec le catéchol). Si avec un Agrobacterium précultivé (c'est-à-dire mis en culture sur milieu riche puis en suspension dans un tampon) ou non, en présence d' α conidendrine, il y a formation d'un polymère brun, l'emploi d'une suspension très dense de cette bactérie précultivée dans un tampon contenant de l' α conidendrine provoque plus rapidement la coloration en rouge de la suspension initialement blanche.

Si les résultats de K.T. WIERINGA (10) sont difficiles à interpréter, les autres données bibliographiques que nous venons de rapporter montrent toutes qu'un milieu pauvre

(ou épuisé) ou qu'un milieu déséquilibré est favorable à la polymérisation oxydative enzymatique des phénols par les microorganismes.

Nous avons montré, plus précisément, qu'une carence en azote est responsable de ce processus du moins pour P. acidovorans.

TROISIEME PARTIE

MECANISMES ENZYMATIQUES

Nous avons montré, chez des bactéries isolées de la phyllosphère, l'existence de deux voies d'oxydation enzymatique des phénols : condensation oxydative et ouverture du cycle benzénique. Nous étudions ici la nature et les caractères des enzymes impliquées dans ces réactions.

I OXYGENASES

Qu'elles participent à la formation de diphénols, comme les monooxygénases ou qu'elles participent à la coupure oxydative du cycle benzénique, comme les dioxygénases, ces deux groupes d'enzymes concourent à l'utilisation des composés phénoliques par les microorganismes.

A Monooxygénases :

Au milieu de base MAB, on ajoute de l'acide p. hydroxybenzoïque (concentration 10^{-2} M dans les cultures).

L'observation des spectres U.V. des filtrats de culture de P. acidovorans réalisés au cours de sa croissance sur ce milieu montre que le pic caractéristique de l'acide p. hydroxybenzoïque à 254 mμ diminue pour disparaître enfin (voir figure 11).

L'acide p. hydroxybenzoïque est consommé par P. acidovorans.

La p. hydroxybenzoate hydroxylase est la première enzyme de la voie d'utilisation de l'acide p. hydroxybenzoïque.

Beaucoup de bactéries peuvent utiliser le p. hydroxybenzoate comme seule source de carbone ; le métabolisme de

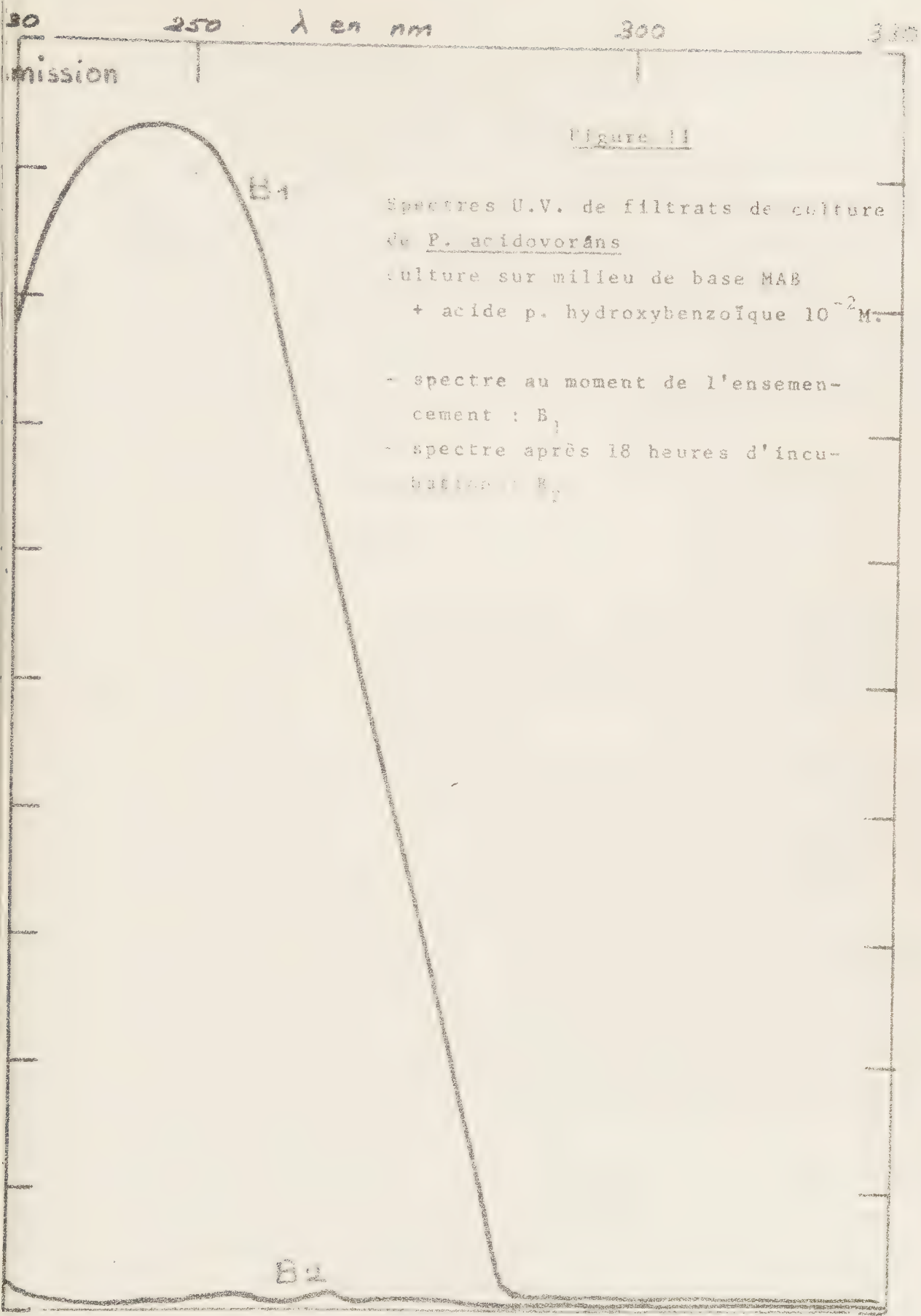


Figure 11

Spectres U.V. de filtrats de culture
de *P. acidovorans*
culture sur milieu de base MAB
+ acide p. hydroxybenzoïque 10^{-2} M.

- spectre au moment de l'ensemencement : B₁
- spectre après 18 heures d'incubation : B₂

ce composé est connu, nous rappellerons seulement quelques propriétés des p. hydroxybenzoate hydroxylases bactériennes.

Responsables de l'hydroxylation en 3 de l'acide p. hydroxybenzoïque, c'est-à-dire de la formation de l'acide protocatéchique, ces monooxygénases, étudiées chez Pseudomonas desmolytica et chez Pseudomonas putida (85) contiennent toutes deux du FAD et sont spécifiques de NADP H H^+ , toutes deux montrent une extrême spécificité envers leur substrat : ces similitudes sont d'un intérêt particulier en raison des voies différentes de dégradation de l'acide protocatéchique chez ces deux microorganismes.

B Dioxygénases :

1. Catéchol :

1.1. Utilisation du catéchol par 8 souches bactériennes : Achromobacter 1 et P. acidovorans, Micrococcus 1 et 2, Pseudomonas 1 et 2, Mulet 0 et 7 :

Les cultures sont faites sur le milieu de base MAB (à l'exception d'une expérience où la source de carbone est constituée par du glucose) auquel on ajoute du catéchol à différentes concentrations ; nous réalisons trois séries d'expériences que résume le tableau n° V.

Les spectres U.V. des filtrats de culture montrent une disparition du pic du catéchol (2760 Å) dans les 3 séries d'expériences et pour toutes les souches étudiées.

Les 8 souches étudiées utilisent donc le catéchol.

De plus, les mesures néphélométriques effectuées dans les 3 séries d'expériences et pour toutes les souches étudiées permettent d'écrire que :

- 1) les faibles concentrations en catéchol (510^{-5} et 10^{-4} M) n'ont pas d'effet sur la croissance
- 2) la phase de latence (le catéchol n'est jamais consommé immédiatement) est plus longue en culture stationnaire.

Concentration en catéchol	Source de carbone	Cultures	Résultats
$5 \cdot 10^{-5} M$	glucose	{ agitées	utilisation
		{ stationnaires	
	mannitol	stationnaires	
$10^{-4} M$	mannitol	stationnaires	du
0			
$2 \cdot 10^{-3} M$	mannitol	{ agitées	catéchol
		{ stationnaires	

TABLEAU V

1.2. Mise en évidence d'une catéchol 1-2 oxygénase chez *P. acidovorans* :

P. acidovorans est cultivé sur le milieu de base MAP d'une part et sur ce même milieu additionné de catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$, d'autre part (cultures agitées à $30^{\circ}C$).

Après 19 heures d'incubation, nous ajoutons du catéchol dans les cultures conduites en présence de ce phénol en quantité égale à celle ajoutée pour la confection du milieu, ceci, pour que les cellules soient bien adaptées au catéchol.

Puis nous préparons un extrait brut acellulaire, comme nous l'avons décrit plus haut après 5 nouvelles heures d'incubation pour la culture en présence de catéchol en même temps que pour l'autre série c'est-à-dire après 24 heures d'incubation sur le milieu de base MAP.

- culture en présence de catéchol

A la solution protéique obtenue (pH 6.7) le substrat, du catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$ est ajouté.

transmission

Figure 12

Spectres U.V. de solutions d'extrait protéique brut
de cultures de P. acidovorans

adaptées au catéchol : A

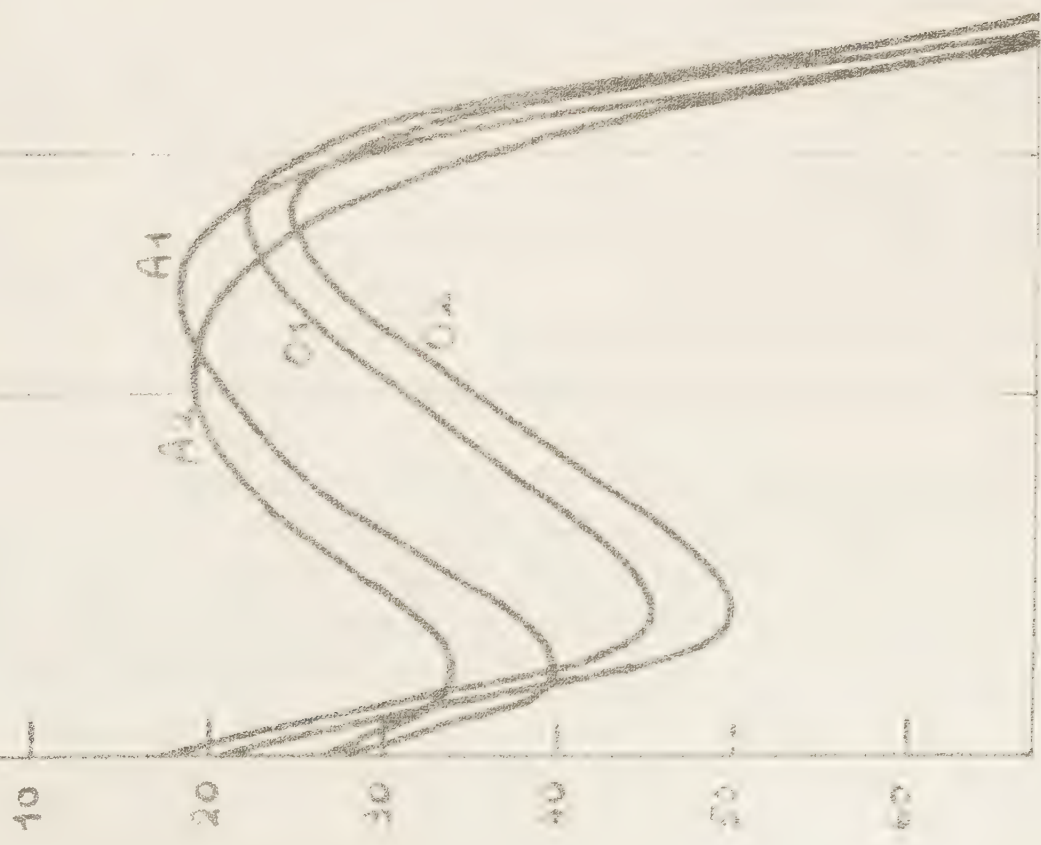
- non adaptées au catéchol : B

• après avoir ajouté du catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$:

A₁ et B₁

• 40 minutes après avoir ajouté du catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$:

A₂ et B₂



Nous réalisons deux spectres dans l'U.V. : le premier immédiatement après l'addition du phénol, le second après 10 minutes d'incubation à 30°C dans une fiole agitée (figure 12).

Nous observons sur le premier spectre (A_1) un léger déplacement du pic du catéchol. Le deuxième spectre (A_2), révèle un pic à 258 m μ pic caractéristique de l'acide *cis cis* muconique, produit d'ouverture du catéchol par la catéchol 1-2 oxygénase.

P. acidovorans, cultivé en présence de catéchol, dans ces conditions possède donc une catéchol 1-2 oxygénase qui permet l'ouverture du cycle benzénique.

- culture sur milieu de base MAB

Une solution protéique réalisée avec des cellules cultivées sur le milieu de base MAB ne montre aucune activité envers le catéchol ; les spectres U.V. (O_1 et O_2) présentent tous deux un maximum d'absorption à 2760 Å, pic du catéchol.

2. Acide protocatéchique :

Nous avons déjà vu, à plusieurs reprises que P. acidovorans est capable d'utiliser l'acide protocatéchique.

Nous essayons d'identifier l'enzyme d'utilisation : P. acidovorans est cultivé sur un milieu semblable au milieu de base MAB mais où le mannitol est remplacé par l'acide protocatéchique (cultures agitées à 30°C).

Après 17 heures et 20 heures d'incubation, nous apportons de l'acide protocatéchique à des concentrations respectives de $10^{-3}M$ et $5 \cdot 10^{-3}M$.

Les spectres U.V. montrent une utilisation rapide de ce substrat par la culture : nous préparons alors un extrait acellulaire.

Après 20 minutes comme après plusieurs heures d'incubation de la solution protéique avec de l'acide protocatéchique $4 \cdot 10^{-3}M$, nous n'observons aucune modification des spectres U.V. : la solution protéique ne présente aucune activité envers l'acide protocatéchique.

Nous réalisons la même expérience, mais, cette fois,

la suspension cellulaire est soumise pendant un temps double aux Ultra Sons et dans un tampon phosphate de pH 7,2.

Nous n'avons enregistré cette fois encore, aucune activité de la solution protéique.

Nous n'avons donc pu identifier l'enzyme d'utilisation de l'acide protocatéchique de P. acidovorans.

Catéchol 1-2 oxygénase :

La catéchol 1-2 oxygénase ou pyrocatechase, que nous avons mise en évidence chez P. acidovorans et qu'il est recommandé de désigner sous le nom de : catéchol : oxygène 1,2 oxydoréductase (E.C.1.13.1.1.), catalyse la coupure oxydative du noyau benzénique du catéchol en acide cis-cis muconique avec consommation d'une mole d'oxygène par mole de substrat oxydé :



Elle a été isolée pour la première fois en 1949 de cellules de Pseudomonas adaptées à l'acide anthranilique par HAYAISHI et HASHIMOTO (86).

Toutes les études ont montré le caractère strictement inductible de sa synthèse ; elle est induite par des cultures sur tryptophane ou sur benzoate de sodium chez différents Pseudomonas. Quelle que soit l'espèce, elle présente les mêmes propriétés :

Son activité est maximum pour un pH de 7 à 8 (87). Elle possède une grande affinité pour le catéchol et O₂ (V_M atteinte pour 210⁻⁵M) (35), une haute spécificité : chez Pseudomonas fluorescens, le catéchol est le seul substrat parmi tous les diphénols essayés (88).

Fortement inhibée par le PCMB (toutes les oxygénases qui participent à la coupure du cycle benzénique contiennent

des groupements SH), elle est inhibée aussi après incubation avec le TIRON, complexant du fer ferrique ; elle ne l'est pas par l'O. phénantroline ou l' α α ' dipyridyle complexants du fer ferreux.

Nous savons qu'elle contient 2 ions de fer trivalent (89) par molécule, 2 ions très fortement liés à la protéine qui ne sont même pas déplacés après 24 heures de dialyse et qui donnent aux solutions concentrées de pyrocatechase une couleur rouge pourpre (90).

Au-dessus de pH 11 et en-dessous de pH 6, l'enzyme perd son activité en même temps que sa couleur.

Le fer ferrique se lierait d'abord au catéchol puis l'ensemble catéchol-fer ferreux formerait avec l'oxygène un complexe ternaire ; c'est ce mécanisme d'action de la pyrocatechase qui semble le plus probable (91).

Catéchol 2-3 oxygénase :

DAGLEY et STOPHER (92) étaient les premiers, en 1959, à décrire l'autre enzyme d'utilisation du catéchol, la catéchol 2-3 oxygénase qui coupe le cycle benzénique pour former de l' α hydroxymuconique semi aldéhyde : (maximum d'absorption dans l'U.V. à 370 m μ).

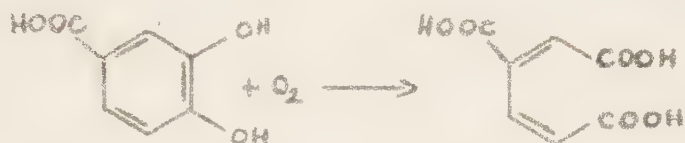


Cette métapyrocatechase est aussi très spécifique (93), contient aussi du fer, un atome par molécule de protéine (94), mais ici, le fer est à l'état ferreux (38). Cette enzyme est instable en présence d'air même à 0°C ; divers réducteurs, NaBH₄ en particulier (94), peuvent restaurer son activité.

...

A. protocatéchique 3-4 oxygénase :

Nous n'avons pu mettre en évidence lors de la dégradation de l'acide protocatéchique par P. acidovorans la formation d'acide β carboxy cis cis muconique qui présente dans l'U.V. un maximum d'absorption à 255 m μ ; c'est le produit d'ouverture de l'acide protocatéchique par l'acide protocatéchique : oxygène 3-4 oxydoréductase (E.C.1.13.1.3.).



Cet isomère de l'acide β carboxymuconique est relativement instable et se transforme facilement en acide cis-trans β carboxymuconique (maximum d'absorption à 265 m μ) mais ce dernier isomère ne peut être métabolisé (95).

La β carboxymuconolactone, seconde étape chez Nocardia avant la formation de l'acide β céto adipique (transparent aux U.V.) absorbe quant à elle vers 216-219 m μ (96).

La protocatéchique 3-4 oxygénase de Pseudomonas aeruginosa (97) montre une activité maximum à pH 8 ; elle est spécifique, elle a peu d'affinité pour le pyrogallol, le catéchol et le 4 méthyl catéchol.

Elle contient 7 atomes de fer par molécule de protéine ; comme la pyrocatechase, elle est d'une couleur rouge, couleur due à la liaison d'ions ferriques avec la protéine.

A. protocatéchique 4-5 oxygénase :

DAGLEY et PATEL étudiant un Pseudomonas capable d'utiliser le p. crésol comme seule source de carbone remarquaient que de l'acide protocatéchique était oxydé avec consommation d'une molécule d'O₂ par mole de substrat mais qu'il n'y avait pas d'acide β carboxymuconique produit ; de plus l'enzyme exigeait la présence d'ions ferreux pour son activité (98).

TRIPPET, DAGLEY et STOPHER établissaient que le produit d'ouverture était le γ carboxy α hydroxymuconique semi aldéhyde (99) (maximum d'absorption à 410 m μ en milieu alcalin et 290 m μ en milieu acide).



Avec des extraits non dialysés de Pseudomonas, la dégradation de l'acide protocatéchique va plus loin, jusqu'à l'acide 2 hydroxy 4 carboxy 2-3 dihydromuconique (maximum d'absorption à 284 m μ) (100).

A l'aide d'études spectrophotométriques, nous n'avons pu mettre en évidence aucun de ces produits d'oxydation.

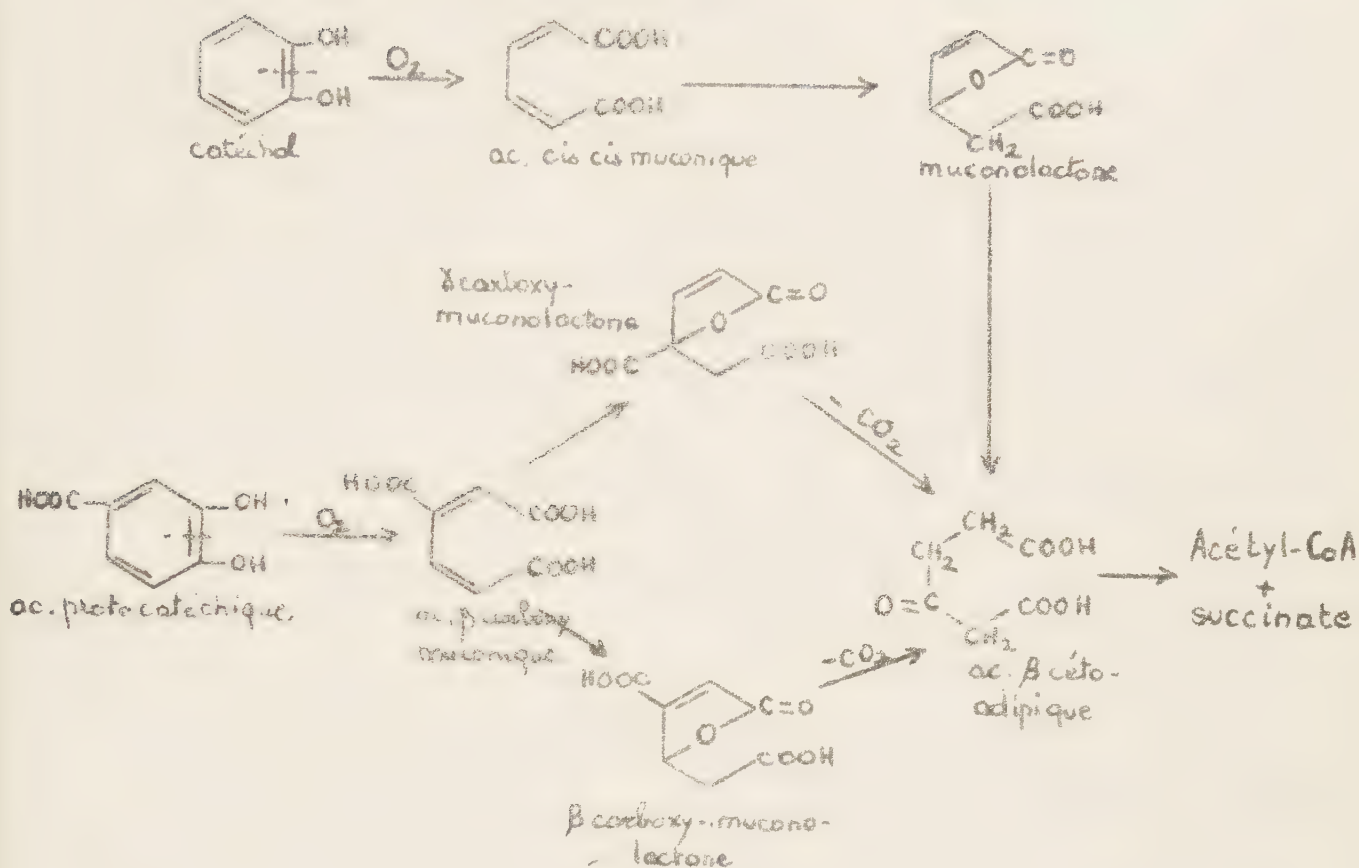
3. Modes d'ouverture du catéchol et de l'acide protocatéchique, métabolisme des produits d'ouverture :

Le schéma ci-dessous résume brièvement le métabolisme des produits d'ouverture du catéchol et de l'acide protocatéchique, les deux modes d'ouverture sont représentés :

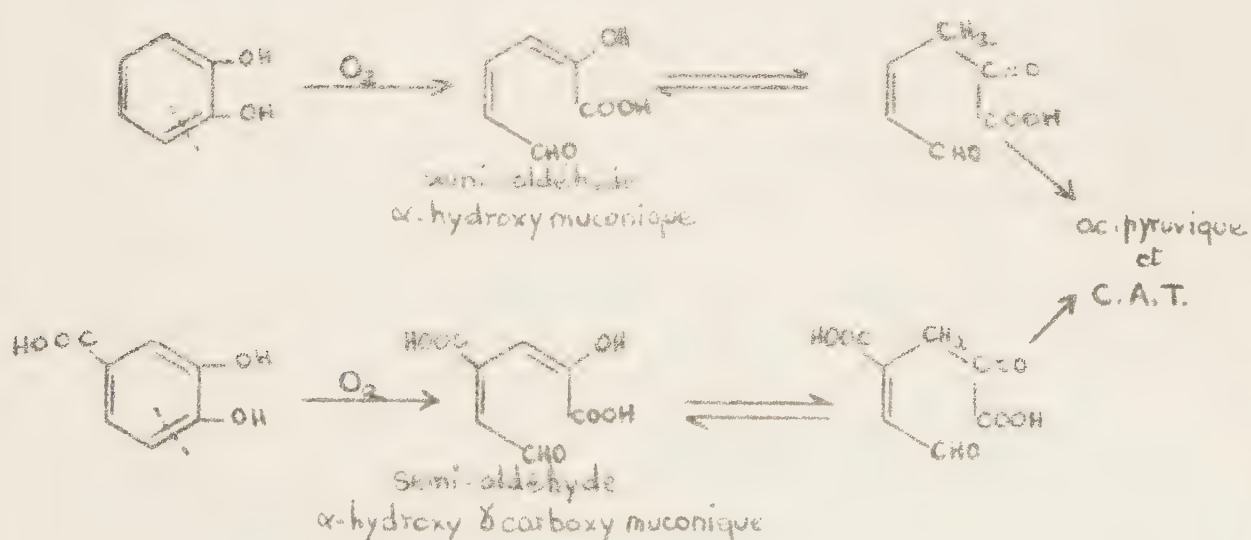
Si l'ouverture en méta (B) est le fait d'un grand nombre de bactéries, elle n'a jamais été décrite chez les champignons. Récemment, BILTON, CAIN et DARAH (101) ont montré la formation par une souche de Penicillium de pyruvate et non de β céto adipate à partir de l'acide protocatéchique ce qui semblerait suggérer l'existence de cette ouverture chez les champignons comme chez les bactéries.

Pour l'ouverture en ortho (A) la voie est commune aux bactéries et aux champignons en ce qui concerne le catéchol. Pour l'acide protocatéchique, alors qu'il y a formation chez Pseudomonas putida (102) et chez les bactéries en général (103) de γ carboxymuconolactone, c'est l'isomère β qu'on a mis en évidence chez les champignons.

Ouverture en ortho (A) :



Ouverture en méta (B) :



4. Déterminisme du mode d'ouverture :

Chez Pseudomonas aeruginosa, la nature du substrat de croissance influence le type d'ouverture du cycle : le benzoate induit une catéchol 1-2 oxygénase et les trois enzymes nécessaires à la transformation du cis cis muconate en acide β cétolipique (102) ; le benzène sulfonate induit une catéchol 2-3 oxygénase. Le transfert d'un milieu au benzène sulfonate dans un milieu au benzoate provoque un changement de voie de dégradation du catéchol et il est possible d'obtenir, lors d'étapes intermédiaires, des cellules contenant les enzymes des deux voies métaboliques "ortho" et "méta".

Bien que des substrats aromatiques différents induisent l'une ou l'autre des deux catéchol oxygénases, chez les microorganismes, il n'existe pas de relation directe entre la structure de l'inducteur et le type d'oxygénase induite. Ainsi, NOZAKI (104) utilise le benzoate pour l'induction d'une catéchol 2-3 oxygénase chez Pseudomonas arvilla mais ce substrat induit une 1-2 oxygénase chez P. putida (105) Moraxella calcoacetica (102) et P. aeruginosa ; si après une culture sur fumarate, on introduit du catéchol dans la culture, P. aeruginosa induit une 2-3 oxygénase et M. calcoacetica une 1-2 oxygénase (106).

Comme la synthèse des deux catéchol oxygénases, chez P. aeruginosa est fortement réprimée par les produits finals des deux voies, la répression catabolique ne joue pas de rôle dans le choix d'une voie plutôt que l'autre (107) ; pour ce dernier microorganisme, comme pour P. putida, le cis cis muconate est l'inducteur de la 1-2 oxygénase (102) tandis que le catéchol induit la 2-3 oxygénase.

Pour M. calcoacetica (109), d'une manière semblable, le cis cis muconate induit la synthèse de toutes les enzymes opérant la conversion du catéchol en β cétolipyl Co A, c'est dire qu'il induit (induction coordonnée) les quatre enzymes nécessaires à sa transformation en β cétolipyl Co A et qu'il induit aussi la catéchol 1-2 oxygénase ; l'acide protocatéchique induit lui-même la protocatéchique 3-4 oxygénase.

Le comportement du cis cis muconate ressemble à celui de la kynurénine qui dans la voie de dégradation du tryptophane

induit la dégradation de ce corps . la kynurénine induit les enzymes par lesquelles elle est formée et dégradée. Il est avantageux pour la cellule que le tryptophane n'induisse pas les enzymes nécessaires à sa propre dégradation car cet acide aminé est incorporé dans des protéines cellulaires et doit être synthétisé quand il n'est pas fourni (110).

Pour conclure cette partie sur l'utilisation des composés aromatiques, il nous faut souligner que, dans les voies métaboliques de dégradation du catéchol et de l'acide protocatéchique par les microorganismes, aucun intermédiaire de type quinone n'intervient.

En 1947 EVANS (111) isolait une o. benzoquinone sous la forme de son dérivé dianilé dans une culture de Moraxella calcoacetica sur du phénol ; aussi, en 1951, FILBY, dans le mécanisme d'assimilation du phénol faisait figurer une quinone après le catéchol (112).

Depuis, tous les travaux ont établi qu'aucun intermédiaire quinonoïde n'est formé lors de l'utilisation des composés aromatiques. Cependant, une étude réalisée en 1962 fait exception : elle rapporte que l'o. benzoquinone est un produit du métabolisme de l'acide protocatéchique par des levures (113). Mais BILTON et CAIN (114), en 1968, reprennent cette étude et montrent que la formation d'o. benzoquinone à partir d'acide protocatéchique n'est pas le fait de levures vivantes.

II PHENOLOXYDASES

Etant donné l'obscurité qui entoure les polyphénol-oxydases, l'identification des enzymes en cause dans nos réactions de brunissement s'avère difficile ; nous précisons cependant quelques-uns de leurs caractères.

A Localisation :

Lors de la préparation d'extrait brut acellulaire de cultures de P. acidovorans adaptées au catéchol (pour la mise en évidence de la catéchol 1-2 oxygénase), une centrifugation (effectuée après le traitement aux Ultra Sons) nous permet d'écarter les débris cellulaires et de recueillir la solution protéique surnageante.

Le culot correspondant, constitué par les débris cellulaires, est mis à incuber dans un tampon phosphate avec du catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$ puis agité comme les cultures. Après 1 heure d'incubation, les débris cellulaires ont pris une teinte noire, la même teinte que les cellules pigmentées par addition de catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$ dans des cultures non adaptées.

Le même résultat est obtenu avec des débris cellulaires provenant de cultures de P. acidovorans non adaptées.

Les témoins, représentés par les culots traités par la chaleur, sont restés blanchâtres.

La fraction particulaire de cellules adaptées au catéchol provoque l'oxydation du catéchol en composés mélanoides.

B Microscopie électronique :

L'activité phénoloxydase dans la fraction particulaire entraîne la formation d'un pigment brun noir dans les cellules traitées par le catéchol. Nous pouvions espérer localiser cette activité en recherchant les altérations morphologiques éventuelles grâce à la microscopie électronique.

Une culture de P. acidovorans après 18 heures d'incubation sur MAB est centrifugée 10 mn à 20000 g à 7°C : le culot est mis en suspension dans le milieu TR.

- Une série est traitée par le catéchol (concentration finale $4 \cdot 10^{-3} M$), il y a brunissement et pigmentation en brun noir des cellules ; après 4 heures d'incubation en présence de catéchol, celles-ci sont lavées deux fois dans un tampon phosphate.

- L'autre série, non traitée, sert de témoin, les cellules sont blanchâtres.

Les culots obtenus sont fixés à l'acide osmique pendant 1 heure 30 puis englobés dans de la géluse avant d'être deshydratés.

Microphotographies électroniques (planche IV) :

- photographie 1 : bactérie non traitée , témoin
- photographie 2 et 3 : bactérie traitée.

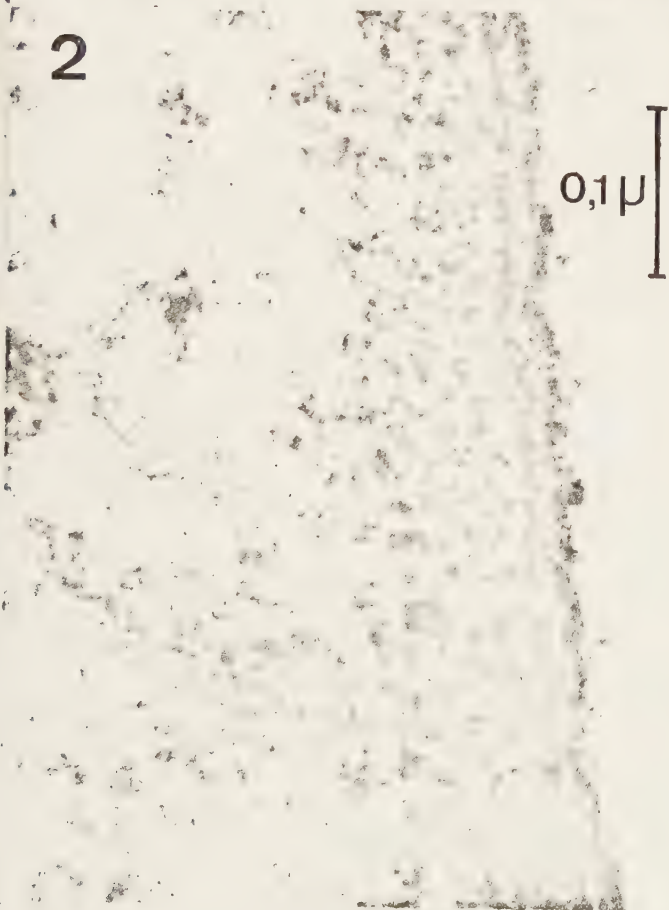
Nous remarquons une différence d'aspect des parois : les parois des cellules traitées ne présentent pas les ondulations des cellules non traitées.

Cette dernière observation montre que le brunissement s'accompagne d'une modification des parois cellulaires.

1



2



3



III CARACTERE CONSTITUTIF OU INDUCTIBLE DES ENZYMES

Inhibition des synthèses protéiques par le chloramphénicol :

Nous savons que le chloramphénicol bloque spécifiquement la synthèse des protéines sans inhiber celle de l'ADN ni des APN.

Nous l'ajoutons à des cultures de P. acidovorans conduites sur milieu de base MAB à la dose de 50 µg/ml et nous laissons incuber une heure.

A Oxygénases :

P. acidovorans est cultivé sur le milieu de base MAB (cultures agitées à 30°C).

Après 23 heures d'incubation nous traitons une série par le chloramphénicol.

Une heure après, nous ajoutons du catéchol $4 \cdot 10^{-4}$ M ou de l'acide protocatéchique $4 \cdot 10^{-3}$ M dans la série traitée par l'antibiotique comme dans la série non traitée.

Nous suivons l'évolution des spectres U.V. des filtrats des deux séries (voir figure 13).

- Série traitée par le chloramphénicol :

Les spectres U.V. demeurent inchangés ; les substrats phénoliques ne sont pas utilisés.

- Série non traitée :

L'effacement des pics d'absorption du catéchol et de l'acide protocatéchique traduit leur consommation par P. acidovorans.

Les expériences montrent que les enzymes responsables de l'utilisation du catéchol et de l'acide protocatéchique sont induites comme d'ailleurs toutes les enzymes d'utilisation des composés aromatiques.

B Phénoloxydases :

P. acidovorans est cultivé sur le milieu de base MAB (cultures agitées à 30°C).

Figure 13

Spectres U.V. de filtrats de cultures de
P. neidovorans

- culture sur milieu de base M1B : A₁
- culture sur milieu de base M1B puis
traitée par le chloroformol : X₁
- après addition de catéchol $4 \cdot 10^{-4}$ M
Spectres A₁ et X₁
- 22 heures après addition de catéchol :
Spectres A₂ et X₂



Après 19 heures d'incubation, nous traitons une série par le chloramphénicol.

Une heure après, nous ajoutons du catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$ dans la série traitée par l'antibiotique comme dans la série non traitée.

Nous assistons alors au brunissement du milieu et à la pigmentation en brun noir des cellules dans les deux séries.

Le chloramphénicol n'a nullement empêché le brunissement de se produire ; les enzymes qui interviennent ne peuvent être le fait d'une réponse spécifique à l'introduction du catéchol dans le milieu de culture.

Le système brunissant est constitutif.

TABLEAU VI

Résultats des expériences d'inhibition avec le chloramphénicol.

Culture de <u>P. acidovorans</u> sur MAB		
+ chloramphénicol		
A		
+ catéchol $410^{-4}M$	Utilisation du catéchol	Pas d'utilisation
+ a. protocatéchique $410^{-3}M$	Utilisation de l'acide protocatéchique	Pas d'utilisation
B		
+ catéchol $410^{-3}M$	Brunissement	Brunissement

IV INHIBITION DE L'ACTIVITE PHENOLOXYDASE

Nous nous sommes demandés si le système enzymatique responsable du brunissement, système particulière constitutif, associé aux enveloppes bactériennes, n'était pas en relation avec les chaînes respiratoires ; aussi avons-nous réalisé des expériences d'inhibition de ces chaînes.

Nous avons enfin étudié l'action des complexants du cuivre sur ces réactions de brunissement.

Dans ces deux séries d'expériences, nous procédons ainsi : P. acidovorans est cultivé à 30°C sur milieu MAB.

Après 18 heures d'incubation

1. des cultures, toujours agitées, sont incubées 40 mn avec les inhibiteurs.
2. des cellules, après centrifugation, sont mises en suspension dans le milieu TB et sont incubées 40 mn avec les inhibiteurs.

Après 40 mn d'incubation en présence des inhibiteurs, dans les cultures comme dans les cellules en suspension dans le milieu TB, nous ajoutons du catéchol (concentration finale $410^{-3}M$) et nous notons les colorations apparues.

(Les solutions stériles d'inhibiteurs et de catéchol sont ajoutées aseptiquement).

Témoins :

- T₁ : cultures bouillies où inhibiteurs puis catéchol ont été introduits.
- T₂ : cultures dans lesquelles le catéchol seul a été ajouté.

A Inhibition des chaînes respiratoires :

Nous utilisons :

- 1^e EDTA (concentration dans les cultures $10^{-3}M$)
- 1^e amytal (concentration $10^{-3}M$)
- 1^e antimycine A (20 µg/ml)
- 1^e azoture de sodium (concentration $510^{-3}M$).

L'amytal (acide 5 éthyl - 5 isoamyl barbiturique)

interviendrait au niveau de la NADH B⁺ deshydrogénase ou après les flavines deshydrogénases : toutes les bactéries ne sont pas sensibles à l'amytal (37).

L'antimycine A bloque le transport des électrons entre les cytochromes b et c mais cet effet inhibiteur ne s'exerce que sur quelques bactéries, en particulier Bacillus cereus (115).

Nous savons que l'azoture de sodium agit sur l'accepteur terminal d'O₂ de la chaîne respiratoire.

Résultats :

Après les 40 minutes d'incubation de l'antimycine A, de l'amytal et de l'azoture dans les cultures, nous procédons à une numération des cellules viables (suspensions dilutions et ensemencement sur milieu glucose peptone).

L'Antimycine A et l'amytal ne provoquent aucune diminution du nombre des organismes viables mais l'azoture provoque la mort de 70 % de ceux-ci.

TABEAU VII

Temps écoulé en minutes entre l'addition du catéchol et l'apparition de la teinte jaune qui précède le brunissement.

	EDTA	Amytal	Antimv. A	Azoture	T ₁	T ₂
	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	20 µg/ml	10 ⁻³ M		
1) cultures :	-	30	40	-	-	40
2) culots :	-	5	10	-	-	10

Que nous utilisions les cultures ou les culots, les résultats sont les mêmes

l'EDTA empêche le brunissement de se produire

l'Amytal accélère cette réaction

1° Antimycine n'a aucun effet
avec l'azoture, nous avons peut être affaire à une
autre réaction d'oxydation.

B Expériences d'inhibition avec des complexants du
cuivre

News utilisera

- le Diethyldithiocarbamate de sodium (Na DDC)

1' a a dinyridyle.

Leurs concentrations dans les cultures sont :

Na EDC : $1,4 \cdot 10^{-3} M$

 $1.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ α α' dipyrrolyle : $4 \cdot 10^{-4} M$

6 10⁻⁴ yr

Résultats :

1) Cultures :

Temps en :		Na DDC	
heures :			
1,4 10 ⁻³ M	T ₁	1 4 10 ⁻⁴ M	T ₁
0	jau- nâtre	jaune	jaunâtre
1/4			jaune
2			beige rosé
66		jaune foncé	brun rouge
			gris noir

Temps en :	$\alpha \alpha'$ dipyridyle					
: heures :	$6 \cdot 10^{-4} M$	:	$4 \cdot 10^{-4} M$	:	T_2	:
:	T_1	:	T_1	:		:
0	: blanc	:	blanc	:	blanc	:
1/4	:	:	:	:	jaune	:
2	: blanc	:	"	:	jaune	:
:	rosé	:	rosé	:	brun	:
66	: gris	:	gris	:	gris	:
:	moyen	:	moyen	:	moyen	:

2) Culots :

Temps en :	$1,4 \cdot 10^{-3} M$	:	$1,4 \cdot 10^{-4} M$	:	$1,4 \cdot 10^{-5} M$	:
: heures :	T_1	:		:		:
0	: jaune	:	jaune	:	jaune pâle	:
:		:	pâle	:		:
1/10	:	:	"	:	"	:
1	:	:		:	jaune vert	:
66	:	:	"	:	noir	:

:	:	:	:	:	:
:	:	$\alpha \alpha$ dipyridyle			:
:	Temps en :	$6 \cdot 10^{-4} M$	:	$4 \cdot 10^{-4} M$	:
:	heures :	T_1	:	T_2	:
:	:	:	:	:	:
:	0	: blanc	: blanc	: blanc	: blanc
:	1/4	:	:	:	: jaune vert
:	1	:	:	:	:
:	66	: gris noir	: gris très	: gris noir	: noir
:	:	:	: pâle	:	:
:	:	:	:	:	:

Les concentrations $1,4 \cdot 10^{-3} M$ et $1,4 \cdot 10^{-4} M$ de diéthyl-dithiocarbamate inhibent l'oxydation du catéchol dans les deux expériences. Une légère inhibition se produit dans la culture à la concentration de $1,4 \cdot 10^{-5} M$ alors que dans les expériences de transfert, un noircissement identique au témoin T_2 est observé.

Quant à l' $\alpha \alpha'$ dipyridyle, elle bloquerait la réaction de brunissement, pendant quelques heures du moins.

Remarques :

Un jaunissement se produit dès l'addition de DCC Na ; ceci est particulièrement net aux concentrations $1,4 \cdot 10^{-4} M$ et $1,4 \cdot 10^{-3} M$.

Ces inhibitions, obtenues avec des chélatants du cuivre, montrent que ce métal intervient dans les réactions enzymatiques de brunissement décrites ici.

Mais soulignons aussi que ce résultat ne peut infirmer l'hypothèse d'une relation entre le système oxydant et les chaînes respiratoires.

V NATURE DU SYSTEME PHENOLOXYDASE

L'étude bibliographique des enzymes bactériennes impliquées dans des réactions de brunissement nous apporte peu de renseignements : en effet, à l'exception des tyrosinases que nous pouvons facilement reconnaître grâce à leur capacité de transformer la tyrosine en mélanines, peu d'enzymes ont pu être identifiées :

N.P. JAYASANKAR et J.V. BFAT, du fait de l'inhibition de l'activité enzymatique de Micrococcus varians par des complexants du cuivre, pensent que la mélanine formée est le résultat de l'oxydation du catéchol par un "système polyphénol oxydase" ; ils expliquent que la synthèse du pigment n'ait pas lieu en culture agitée par une inhibition du système oxydase par O_2 ou par la dégradation rapide des métabolites (4).

V. SUNDMAN et coll. (83) comparent l'oxydation par une laccase, une peroxydase et par leur souche d'Agrobacterium de la methoxy p. hydroquinone ; ils constatent la formation de methoxy p. quinone et de composés bruns avec la peroxydase tandis qu'ils avaient observé la formation des seuls produits bruns avec Agrobacterium ; de plus, cette activité phénoloxydase se montre spécifique puisque du catéchol, de la p. benzohydroquinone, du guaiacol et de la p. phénylènediamine -substrats de la laccase- seul, ce dernier composé provoque un accroissement de la consommation d' O_2 par des cellules lavées et mises en suspension dans un tampon.

SUNDMAN et LAIFIA (11) sur une centaine de souches bactériennes isolées du sol, étudient l'existence des activités methoxy p. hydroquinone oxydase, catécholase, laccase, oxydase, cytochrome oxydase et peroxydase ; par une analyse mathématique des résultats, ces auteurs, s'ils concluent à l'existence d'une relation entre l'activité methoxy p. hydroquinone oxydase et les activités p. diphenol oxydase, peroxydase et surtout o. diphenol oxydase, remarquent que cette étude montre aussi combien les méthodes pour mettre en évidence les activités laccase, oxydase et cytochrome oxydase sont peu spécifiques. Nous avons déjà signalé une analogie entre l'oxydation de la methoxy p. hydroquinone par Agrobacterium et l'oxydation du catéchol par P. acidovorans : une relation étroite entre l'activité

methoxy p. hydroquinone oxydase et o. dihydroxyphenol oxydase ne nous étonne pas : ce résultat, ceux de KONONOVA, déjà exposés les nôtres concordent parfaitement.

KRISHNAMURTHI, BUCKLEY et DIERRE trouvent que c'est une L Amino Acide oxydase (E.C.1.4.3.2.) qui est responsable de la formation d'un pigment rouge par un Achromobacter (reclassé comme Proteus rettgeri) en présence de tryptophane ; c'est une enzyme contenue dans la fraction particulaire capable d'oxyder huit autres L amino acides mais qui ne produit de pigment qu'avec le tryptophane (116).

Dans notre laboratoire, lors de l'identification de souches brunissant des milieux aux extraits de feuilles, seulement 24 souches sur 52 présentaient une réponse positive au test de KOVACS, utilisé pour la mise en évidence de l'activité oxydase (12).

Comparons les caractères de l'enzyme ou des enzymes de P. acidovorans responsables des réactions de brunissement avec ceux d'enzymes connues susceptibles d'intervenir dans l'oxydation des phénols.

- Nous n'avons noté aucune action sur la tyrosine, mais une oxydation de l'hydroquinone, il ne peut donc s'agir d'une tyrosinase.

- Les laccases sont essentiellement extracellulaires, elles ne sont pas inhibées par des agents chélatants (117). elles oxydent le guaiacol en produits rouge-brun ; ces propriétés ne ressemblent pas à celles que nous avons trouvées ; et si les laccases sont très répandues parmi les végétaux et les champignons qui dégradent le bois, on n'en a trouvées que chez quelques bactéries, des Streptomycètes (118). Cependant, rappelons que les laccases sont les moins spécifiques des phénoloxydases elles constituent plutôt un groupe d'enzymes voisines qui diffèrent par leur teneur en cuivre, leur spécificité et leur pH optimum (117).

- Les peroxydases catalysent l'oxydation par H_2O_2 d'anines aromatiques, de certains composés hétérocycliques, d'ions inorganiques mais aussi de phénols ; elles joueraient aussi un rôle dans l'hydroxylation de composés aromatiques (119). L'oxydation du pyrogallol, de l'acide gallique et du guaiacol par les systèmes peroxydase est connue depuis long-

temps. On utilisait l'oxydation du pyrogallol en purpurogalline pour mesurer l'activité des peroxydases. Rencontrées très souvent dans les végétaux supérieurs, les peroxydases sont rares chez les microorganismes (120). c'est la cytochrome c peroxydase de levure qui est la plus étudiée (121), (122), (123). Le catéchol est oxydé en o. benzoquinone (124), le guaiacol en produit rouge brun d'où a été isolé le 2 2' dihydroxy 3 3' dimethoxy diphényl (125), le p. crésol en un produit blanc, trois composés ont pu être identifiés (126), l'hydroquinone en p. benzoquinone (45). YONETANI et RAY (122), étudiant les propriétés d'une cytochrome c peroxydase de levure, la qualifiant de hautement spécifique pour le cytochrome c bien que l'acide ascorbique, le guaiacol et le pyrogallol soient aussi des substrats de cette enzyme.

- Les catalases qui existent dans toutes les bactéries aérobies à l'exception peut-être d'Acetobacter neroxydans (120) peuvent concourir à l'oxydation d'alcool et d'autres donneurs d' H_2 comme les phénols par divers peroxydes ; elles présentent beaucoup de propriétés communes avec les peroxydases, ce que montrent les travaux réalisés sur Micrococcus lyso-deikticus (127), (128) et sur Rhodopseudomonas spheroides (129) il s'agit de réactions d'oxydation couplées. p. crésol et pyrogallol sont oxydés (130), le pyrogallol est transformé en purpurogalline ; phénol, catéchol, hydroquinone, résorcinol et guaiacol sont aussi oxydés (131).

La localisation dans la fraction particulière de l'activité catéchol oxydase de P. acidovorans, la sensibilité de cette activité à l'état physiologique des cellules, son caractère constitutif, la corrélation entre la pigmentation des cellules et leur mort peuvent suggérer que les enzymes qui interviennent dans le brunissement sont des protéines liées à l'activité respiratoire. C'est une propriété quasi générale des cytochrome oxydases bactériennes que d'oxyder en plus de la forme réduite des cytochromes l'acide ascorbique et l'hydroquinone (132). - La plupart des potentiels normaux d'oxydoréduction des cytochromes b, c et a connus sont compris entre 0,3 et 0,4 V (133) et les potentiels normaux d'oxydoréduction des systèmes o. quinone - o. diphénol et p. quinone - hydroquinone

sont respectivement 0,35 et 0,28 V.

Une telle enzyme est induite quand Pseudomonas aeruginosa est cultivé en présence de nitrates, en aérobiose et en absence de nitrate et de glucose, une autre cytochrome oxydase est produite en grande quantité mais elle n'oxyde pas l'hydroquinone ; en aérobiose et sur glucose, une cytochrome oxydase de type hydroquinone oxydase constitue un troisième type de système respiratoire (134).

Les spectres hématiniques bactériens varient aussi dans leur constitution comme dans les proportions des différents constituants en fonction de différents facteurs :

nature de la source carbonée.

aération (135), (136),

taux de croissance (137).

Pseudomonas fluorescens possède deux sortes de respiration terminale, l'une cytochromique, l'autre flavinique (138) l'orientation qualitative et quantitative de cette alternative respiratoire est essentiellement réglée par le rapport de la pression partielle de l'oxygène à la concentration en substrat nutritif mis à la disposition de la bactérie (139) : les effets de la catéchine sur la respiration flavinique (stimulation de l'anabolisme protidique et modifications au niveau de la membrane plasmique) sont interprétés comme une induction proportionnée d'une respiration terminale complémentaire (140).

La mise en évidence chez Saccharomyces cerevisiae d'un pigment phénolique fonctionnant dans la chaîne respiratoire entre les cytochromes et l'oxygène et surtout le fait qu'il ait été remplacé avec succès par la p. quinone ou le catéchol (141), (142) montrent indubitablement le rôle de transporteur électronique que certains phénols (ou leurs dérivés oxydés) peuvent jouer dans la respiration.

Il est évident que l'action du catéchol sur P. acidovorans ne peut expliquer la formation de pigments mélanoides si ce phénol et l'o. benzoquinone jouent le rôle de transporteur d'électrons au sens strict le brunissement implique une oxydation irréversible du catéchol en o. quinone.

Avec les résultats dont nous disposons, nous voyons qu'il est impossible d'identifier l'enzyme ou les enzymes de P. acidovorans responsables des réactions de brunissement à des enzymes connues.

Nous avons montré que le catéchol est oxydé par une fraction particulière de P. acidovorans, il y a formation d'un pigment brun noir ; ce même pigment est élaboré par des cellules entières quand le catéchol est ajouté en quantités suffisantes. Les concentrations nécessaires à cette pigmentation varient avec l'état physiologique des cellules, l'âge des cultures, la composition du milieu, l'aération interviennent.

Il en est de même avec l'acide protocatéchique pour la production du pigment brun par les cellules entières ; les concentrations pour lesquelles le brunissement a lieu sont ici toutes plus élevées.

Avec le catéchol, comme avec l'acide protocatéchique la pigmentation s'accompagne de la mort des cellules.

C O N C L U S I O N

Nous avons montré qu'une souche de Pseudomonas acido-
dovorans, isolée de la phyllosphère, provoquait l'oxydation du
catéchol, de l'acide protocatéchique et de l'hydroquinone en
composés mélanoides mais que ce Pseudomonas était aussi capable
d'utiliser l'acide p. hydroxybenzoïque, le catéchol et l'acide
protocatéchique.

Pour le catéchol et l'acide protocatéchique, il
existe donc deux voies d'oxydation, condensation oxydative et
utilisation, nous avons précisé leurs caractères et dans
quelles conditions elles fonctionnent.

Nous résumons ici l'essentiel :

I A Addition directe dans le milieu de culture

		Addition de catéchol	
Milieu de			
culture	$410^{-3}M$	$410^{-4}M$	
		Après 20 heures d'incubation	Après 7 jours
Mannitol -	Condensation :		Condensation :
Asparagine	oxydative	Utilisation	OX.
(MAB)			et
			Utilisation
Mannitol -			
Asparagine	Utilisation	Utilisation	
+ catéchol			
$410^{-3}M$			

A Addition directe dans le milieu de culture (suite)

:	:	Addition d'acide protocatéchique	:	:
:	:		:	:
:	:	$4 \cdot 10^{-2} M$	:	$4 \cdot 10^{-3} M$
:	:		:	:
:	:	Après 20 heures d'incubation:	:	Après 7 jours:
:	:		:	:
:	Mannitol -	Condensation :	:	Condensation :
:	Asparagine	oxydative :	Utilisation :	OX.
:		:	:	et
:			:	Utilisation
:			:	:

B Culture puis transfert des cellules :

:	1. Culture sur milieu Mannitol - Asparagine (MAB)	:	:
:		:	:
:	2. Transfert des cellules dans 2 milieux différents :	:	:
:		:	:
:	Milieu TB	:	Milieu TB + asparagine
:	(dépourvu de source d'azote	:	
:	et de carbone)	:	
:	+ catéchol $4 \cdot 10^{-3} M$	:	
:		:	
:	Condensation oxydative	:	Utilisation
:		:	

II UTILISATION

- Catéchol : nous avons mis en évidence, dans la fraction soluble une catéchol 1-2 oxygénase (catéchol : oxygène 1-2 oxydoréductase, E.C.1.13.1.1.). Elle est induite.

Condensation oxydative :

L'activité catéchol oxydase se trouve dans la fraction particulaire, elle est inhibée par :

- l'EDTA
- l'azoture de sodium
- le DDC de sodium
- l' α α 'dipyridyle.

La condensation oxydative s'accompagne de la mort des cellules.

En ce qui concerne la dégradation de composés aromatiques par les champignons, les travaux se sont concentrés presque'exclusivement sur les Basidiomycètes agents de la pourriture blanche qui attaquent comme les agents de la pourriture brune les polysaccharides-du bois mais aussi, à la différence de ces derniers, la lignine (143).

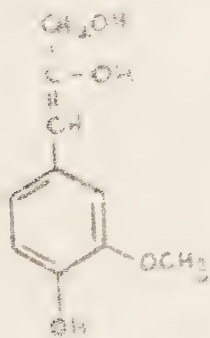
L'acide α . hydroxyphénylpyruvique, l'acide férulique, l'acide 3 méthoxy 4 hydroxyphénylpyruvique, le guaïacyl glycérol sont très facilement métabolisés par Polyporus versicolor et Fomes fomentarius cependant tous ces composés sont partiellement convertis en polymères colorés (144).

Cultivés sur un milieu gélosé contenant de l'acide gallique ou tannique, la plupart des organismes de la pourriture blanche produisent une coloration brune du milieu autour du mycélium ; c'est la réaction de BAVENDAMM (145) due à la présence d'enzymes extracellulaires laccases, tyrosinases -la présence de peroxydase a aussi été signalée. L'existence d'une relation entre cette réaction de BAVENDAMM et la capacité des organismes à dégrader la lignine est discutée

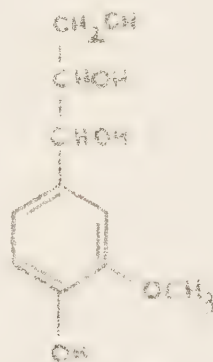
Des chercheurs ont utilisé cette réaction avec l'acide tannique pour isoler d'échantillons de sol des champignons qui dégradent la lignine ; une étude portant sur plus de deux cents espèces a montré que 96 % des champignons de la pourri-

ture blanche présentaient une réaction de BAVENDAMM positive (146). La dégradation de la lignine implique sa coupure en petites molécules et l'utilisation des composés phénoliques ainsi produits, c'est-à-dire la coupure du cycle benzénique ; quant aux phénol oxydases responsables de la réaction de BAVENDAMM, elles interviennent dans la biosynthèse de polymères quinonoïdes bruns (147). Nous reconnaissons les deux voies d'oxydation que nous avons étudiées.

Pour HURST et BURGESS (148) si la relation entre ces deux activités n'est pas fortuite, l'action de la laccase et de la tyrosinase doit présenter une alternative : oxydation du noyau ou oxydation de la chaîne latérale. On a déjà montré l'action de phénol oxydases sur des chaînes latérales ; des enzymes "semblables à la laccase" de Fomes fomentarius et de Collybia velutipes catalysent la coupure oxydative des chaînes latérales du 3 méthoxy 4 hydroxyphényl pyruvate, de l'alcool β hydroxy coniférylique (I) et du guaïacyl glycérol (II) (149).

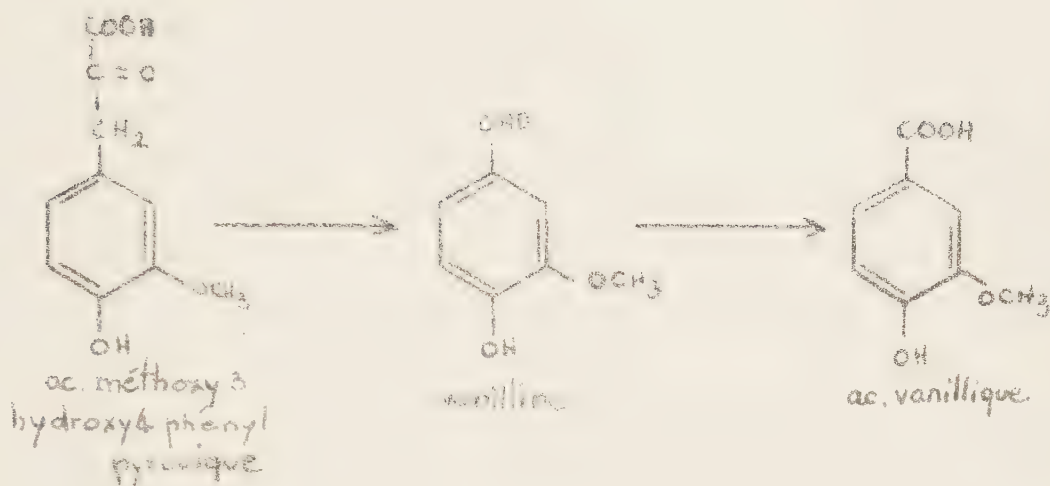


(I)



(II)

La laccase de Psalliota campestris et une peroxydase catalysent ces mêmes coupures oxydatives ; il y a formation de vanilline, d'acide vanillique et d'acide oxalique :



Ajoutons qu'une partie des trois substrats étudiés est transformée en polymères par la laccase de P. campestris et la peroxydase.

Nous venons de montrer que nous retrouvons, chez les champignons, les deux voies d'oxydation : utilisation et condensation oxydative.

Et, dans le sol, l'oxydation des produits de dégradation de la lignine pourrait se faire, aussi, suivant ces deux voies (150) ; la condensation oxydative correspondrait ici à la formation des substances humiques.

Qu'il s'agisse de la dégradation de la lignine ou de cyclolignanes, c'est-à-dire de la voie du vanillate (151) ou de l'isovanillate (6), qu'il s'agisse de la dégradation d'autres tissus végétaux où des transformations d'aglycones peuvent suivre une hydrolyse des hétérosides, l'acide protocatéchique et le catéchol sont des intermédiaires essentiels.

Nos résultats pourraient, alors, contribuer à expliquer les raisons pour lesquelles la microflore du sol assure l'un ou l'autre de ces modes de transformation des phénols,

pourquoi, dans un sol, on assiste à la minéralisation de composés aromatiques et, dans un autre, à leur transformation en polymères insolubles, en humus.

Des différences considérables ont été trouvées dans la stabilité biologique de composés aromatiques

- 90 % d'acide vanillique dégradé en 5 jours en milieu liquide (152) contre 50 % après 150 jours dans un sol (153).

- étudiant la dégradation de la lignine, FLAIG observe, dans un compost, la formation de dérivés quinoniques qui se polymérisent en nucleus humique (154). MAYAUDON et BATISTIC montrent que dans un autre sol, la lignine est décomposée sans formation de nucleus humique (155).

Nos résultats, condensation oxydative dans le cas de milieu pauvre ou de microorganismes en mauvais état physiologique, correspondraient bien aux observations rapportées que nous résumons ainsi : dans les sols à microflore bactérienne assez abondante, sols bruns par exemple ($C/N = 10$) polymérisation oxydative, dans les sols à mor ($C/N \geq 25$), pas de transformation.

Nous ajouterons enfin que les numérations bactériennes sur sol, par microscopie, donnent peut-être cent fois plus d'organismes que par culture; on est persuadé que les bactéries du sol sont des survivants non viables pour une large part (156) donc remplissant les conditions que nous avons trouvées pour réaliser le brunissement.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 MANGENOT F. JACQUIN F. METCHE M.
A propos des interactions plante-sol.
I. Les exsudats foliaires peuvent-ils être une source de substances humiques ?
Oecol. Planta. 1, 79-102, 1966.
- 2 WINOGRADSKY S.
Etudes sur la microbiologie du sol. Analyse microbiologique du sol, principes d'une nouvelle méthode.
Ann. Instit. Pasteur 48, 89-134, 1932.
- 3 HARDISSON C. POCHON J.
Synthèse de substances parahumiques par *Azotobacter chroococcum*.
I. Conditions de culture et extraction de la substance.
Ann. Inst. Pasteur 111, 66-75, 1966.
- 4 JAYASANKAR N.P. BHAT J.V.
Mode of attack on phenol by a *Micrococcus* sp. isolated from coir nets.
Canad. J. Microbiol. 5, 1031-1039 1966.
- 5 MULLAKHANBHAI M.F.
The degradation of aromatic compounds by *Arthrobacter* species.
J. Indian. Inst. Sci. 50, 4, 327-344, 1968.
- 6 SUNDMAN VERONICA HARO K.
On the mechanism by which cyclolignolytic *Agrobacteria* might cause humification.
Finska Kemists Medd. 75, 4, 111-118, 1966.

- 7 BENJAMIN A.M. THAMANE D.V.
Observations on the formation of a pigment by strains of *E. coli*.
Arch. Mikrobiol. 53, 242-247, 1966.
- 8 POLSTER SVOBODA
Production of a reddish brown pigment from D.L. tryptophane by enterobacteria of the *Proteus-Providencia* group.
Experientia 20, 637-638, 1964.
- 9 MENCHER J.R. HEIM A.H.
Melanin biosynthesis by *Streptomyces lavendulae*.
J. Gen. Microbiol., 28, 665-670, 1962.
- 10 WIERINGA K.T.
The humification of high-moor peat.
II. Soil microorganisms decomposing aromatic compounds and synthesis of complex humus like substances.
Plant and Soil XXI, 3, 333-344, 1964.
- 11 SUNDMAN VERONICA LAIHIA K.
The occurrence of methoxy p. benzohydroquinone oxidizing ability among soil bacteria.
Finska Kemists. Medd. 77, 142-152, 1968.
- 12 MULOT F.
D.E.S. Faculté des Sciences de Nancy, 1970.
- 13 ROGOFF M.H.
Oxidation of aromatic compounds by bacteria.
Adv. Appl. Microbiol. 3, 193-221, 1961.
- 14 GUYER M. HEGEMAN G.
Evidence for a reductive pathway for the anaerobic metabolism of benzoate.
J. Bacteriol. U.S.A. 99, n° 3, 906-7, 1969.

- 15 DUTTON P.L. EVANS W.C.
The metabolism of aromatic compounds by a *Rhodopseudomonas palustris*. A new reductive method of aromatic ring metabolism.
Biochem. J. GB 113, 3, 525-36, 1969.
- 16 CZEKALOWSKI J.W. SKARZYNSKI B.
The breakdown of phenols and related compounds by bacteria.
J. Gen. Microbiol. 2, 231-238, 1948.
17. KRAMER N. DOETSCH R.H.
The growth of phenol utilising bacteria on aromatic carbon sources.
Arch. Biochem. 26, 401-405, 1950.
- 18 TABAK H.H. CHAMBERS C.W. KABLER P.W.
Microbial metabolism of phenolic compounds and aromatic hydrocarbons by phenol adapted bacteria.
J. Bact. 87, 910-919, 1964.
- 19 DAGLEY S. STOPHER D.A.
A new mode of fission of the benzene nucleus by Bacteria.
Biochem. J. 73 16 P, 1959.
- 20 DAGLEY S. THOMAS J. GIBSON D.T.
Bact. Proc. 104, 1964.
- 21 BLAKLEY E.R. KURZ W. HALVORSON H. SIMPSON F.J.
The metabolism of phenylacetic acid by a *Pseudomonas*.
Can. J. Microbiol. 13 147-157, 1967.
- 22 BLAKLEY E.R. SIMPSON F.J.
The microbial metabolism of cinnamic acid.
Can. J. Microbiol. 10, 175-185, 1964.
- 23 EVANS W.C.
The microbial degradation of aromatic compounds.
J. Gen. Microbial. 32, 177-184, 1963.

- 24 GIBSON D.T. WOOD J.M. CHAPMAN P.J. DAGLEY S.
Bacterial degradation of Aromatic compounds.
Biotechnol. Bioeng., IX, 33-44, 1967.
- 25 GIBSON D.T.
Microbial degradation of aromatic compounds.
Science, 161, 3846, 1093-7, 1968.
- 26 ADACHI K. IWAYAMA Y. TANIOKA H. TAKEDA Y.
Purification and properties of homogentisate oxygenase
from *Pseudomonas fluorescens*.
Biochim. Biophys. Acta. 118, 1, 88-97, 1966.
- 27 CHAPMAN P.J. DAGLEY S.
Oxidation of homogentisic acid by cell free extracts of
a *Vibrio*.
J. Gen. Microbiol. 196, 28, 251-256, 1962.
- 28 SEIDMAN M.M. TOMS ANNE, WOOD J.M.
Influence of side chain substituents on the position of
cleavage of the benzène ring by *Pseudomonas fluorescens*.
J. Bacteriol. 97, 3, 1192-1197, 1969.
- 29 RIBBONS D.W. WATKINSON R.J.
A new ring cleavage enzyme : 2,3 dihydroxybenzoate
oxygenase.
Adv. Chem. Serv. U.S.A. 77, 252-9, 1968.
- 30 RIBBONS D.W.
Bacterial oxidation of 2,3 dihydroxybenzoic acid. A new
oxygenase.
Biochem. J. G.S. 99, 2, 30 P 31 P, 1966.
- 31 STANIER R.Y. HEGEMAN G.D. ORNSTON L.N.
The mechanism of so called "sequential induction" in
Pseudomonas fluorescens.
Colloq. Inter. Centre Natl Rech. Sci. (Paris) n° 124,
227-236, 1963.

- 32 STANIER R.Y.
Simultaneous adaptation : a new technique for the study
of metabolic pathways.
J. Bacteriol. 54, 339-346, 1947.
- 33 HAYAISHI O.
Crystalline Oxygenases of Pseudomonads.
Bacteriol. Rev. U.S.A. 30, 4, 720-731, 1966.
- 34 MASON H.S. FOWLKS W.L. PETERSON E.
Oxygen transfer and electron transport by the phenolase
complex.
J. Am. Chem. Soc. 77, 2914-2915, 1955.
- 35 HAYAISHI O. KATAGIRI M. ROTHEBERG S.
Mechanism of the pyrocatechase reaction.
J. Am. Chem. Soc. 77, 5450, 1955.
- 36 SUZUKI I.
Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of
Thiobacillus thiooxidans.
Biochim. Biophys. Acta 104, 359-371, 1965.
- 37 HAYAISHI O.
Oxygenases (oxygen transferring enzymes).
Biological Oxidations T.P. SINGER Ed.
Intersciences Pub. N.Y., 581-601, 1968.
- 38 YAMAMOTO S. KATAGIRI M. MAENO H. HAYAISHI O.
Salicylate hydroxylase a monooxygenase requiring flavin
adenine dinucleotide.
I. Purification and general properties.
J. Biol. Chem. 240, 3408-3413, 1965.
- 39 KATAGIRI M. MAENO H. YAMAMOTO S. HAYAISHI O.
Salicylate hydroxylase a monooxygenase.
II. The mechanism of salicylate hydroxylation to catéchol.
J. Biol. Chem. 240, 8, 3414-3417, 1965.

- 40 YANO K. HIGASHI N. ARIMA K.
p. hydroxybenzoate hydroxylase : conformational changes
in crystals of holoenzyme vs holoenzyme - substrate
complex.
Biochem. Biophys. Pres. Comm. 34, 1, 1-7, 1969.
- 41 KONONOVA M.M.
Les processus de transformation de la matière organique
au sol et leurs relations avec la fertilité du sol.
Podwoveaenie 8, 17, 26, 1968.
- 42 BROOKS D.W. DAWSON C.R.
Aspects of tyrosinase Chemistry in Biochemistry of Copper.
343-357 Academic Press New York 1966.
- 43 BURGESS N.A.
Enzymes associated with phenols 1-7 in Enzymes chemistry
of phenolic compounds.
J.B. Pridham Pergamon Press, 1963.
- 44 BENDALL D.S. GREGORY R.P.F.
Purification of phenol oxidases 7-22 in Enzymes chemistry
of phenolic compounds.
J.B. Pridham Pergamon Press, 1963.
- 45 BROWN B.R.
Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols
167-201 in Oxidative coupling of phenols.
Taylor et Batters by Eds. M. Dekker New York, 1967.
- 46 ROLLAND M. LISSITZKY S.
Dopa oxydation I et II.
Biochim. Biophys. Acta 56, 1, 83, 110, 1962.
- 47 KERTESZ D. ZITO R.
Kinetic studies of the polyphenoloxidase action : Kinetics
in the presence of reducing agents.
Biochim. Biophys. Acta, 64, 153-167, 1962.

- 48 RAPER H.S.
The tyrosinase-tyrosine reaction. Production from tyrosine of 5,6 dihydroxyindole and 5,6 dihydroxyindole 2 carboxylic acid the precursors of melanin.
Biochem. J. 21, 39, 1927.
- 49 MACRAE A.R. DUGGLEBY R.G.
Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase.
Phytochem. G.B. 7, 5, 855-861, 1968.
- 50 THOMAS M.
Melanins 661-675 in Modern Methods of Plant Analysis.
K. Paech M.W. Tracey Ed. Springer Verlag Berlin 1955.
- 51 MASON H.S.
Structure on melanins in Pigment cell biology.
Gordon Ed. Academic Press New York, 1959.
- 52 SWAN G.A.
Chemical structure of melanins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 100, 2, 1005-1019, 1963.
- 53 NICOLAUS R.A.
Melanins.
Herrmann Paris pp 310, 1968.
- 54 INOUE E.
Studies on mutations of Pseudomonas aeruginosa.
J. Am. Med. Women's Assoc. 16, 858-860, 1961.
- 55 ARONSON J.N. VICKERS R.S.
Conversion of m. tyrosine to dihydroxytyrosine by a tyrosine hydroxylase from Bacillus cereus.
Biochim. Biophys. Acta, 110, 624-626, 1965.
- 56 PIATELLI M. FATUROSSO E. NICOLAUS R.A. MAGNO S.
The structure of melanins and melanogenesis.
V. Ustilagomelanin.
Tetrahedron 21, 3229-3236, 1965.

- 57 NICHOLS J.L. CAMPBELL J.N.
Production of a melanin like pigment as a result of cresol inhibition of normal pigmentation in *Micrococcus violagabriellae*.
Canad. J. Microbiol. 10, 633-640, 1964.
- 58 POCHON J. WANG I.
Formation des substances humiques par les *Azotobacter* à partir des noyaux benzéniques.
C.R. Acad. Sci. Paris 230, 151-152, 1950.
- 59 HARDISSON C. ROBERG GERO M.
Synthèse de substances parahumiques par *Azotobacter Chroococcum*.
II. Etude chimique comparative avec des extraits humiques de sols.
Ann. Inst. Pasteur, 111, 486-496, 1966.
- 60 TOLLIN G. STEELINK C.
Biological polymers related to catechol : E.P.R. and infrared studies of melanin, tannin, lignin, humic acid and hydroxyquinones.
Biochim. Biophys. Acta 112, 2, 377-379, 1966.
- 61 ROBSON N.C. SWAN G.A.
Studies on the structure of some synthetic melanins.
Structure Contrôle Melanocyte.
6 th International Pigment Cell Conf. Sofia, Bulg.
155-162, 1965.
- 62 FORSYTH W.G.C. QUESNEL W.C.
Intermediates in the enzymic oxidation of catechol.
Biochim. Biophys. Acta 25, 155-160, 1957.
- 63 FORSYTH W.G.C. QUESNEL W.C. ROBERTS J.B.
Diphenylène dioxide 2,3 quinone : an intermediate in the enzymic oxidation of catechol.
Biochim. Biophys. Acta, 37, 322-326, 1960.

- 64 NICOLAUS E.A. PIATELLI M.
Progress in the chemistry of natural black pigments.
Acad. Sci. Napoli, 4, XXXII 1-17, 1965.
- 65 BROWN B.R. WHITEOAK R.J.
Polymerisation of flavans.VII Oxidative polymerisation
of catechin.
J. Chem. Soc. G.E. Suppl. 2, 6084-6090, 1964.
- 66 HATHWAY D.E.
The transformation of gallates into ellagate.
Biochem. J. 67, 445-450, 1957.
- 67 LINDGREN E.O.
Dehydrogenation of phenols.
II. Dehydrogenation polymers from guaiacol.
Acta chem. Scand. 14, 2089-2096, 1960.
- 68 MASON H.S. INGRAM D.J.E. ALLEN E.
The free radical property of melanins.
Arch. Biochem. Biophys. 86, 225, 1960.
- 69 MUSSO H.
Coupling mechanisms dans Oxidative coupling of phenols.
1-94 édit. TAYLOR et BATTERSBY, M. DEKKER, New-York,
pp. 387, 1967.
- 70 NAKAMURA T.
On the process of enzymatic oxidation of hydroquinone.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 2, 111-113, 1960.
- 71 MASON H.S.
dans Pigment Cell Biology, M. Gordon Academic Press, 1959.
- 72 DAWSON C.R. TARPLEY W.B.
The pathway of catechol-tyrosinase reaction.
Ann. Acad. of Sciences N.Y. 100, 937-950, 1963.

- 73 SUZUKI Y.
Polyphenolase and Peroxidase in the Tomato root tissue
and the oxidation of Ornithine.
Physiol. Plantarum 11, 92-98, 1958.
- 74 JACKSON H. KENDAL L.P.
The oxidation of catechol and homocatechol by tyrosinase
in the presence of Amino Acids.
Biochem. J. 44, 477-487, 1949.
- 75 MASON H.S. PETERSON E.W.
Melanoproteins.
I. Reactions between enzyme generated quinones and amino
acids.
Biochim. Biophys. Acta, 111, 134-146, 1965.
- 76 MASON H.S.
Reactions between quinones and proteins.
Nature April 30, 771-772, 1955.
- 77 MICHALEK HANNA SKARKOWSKA LUDMILLA
The quinone amino acid complexes and polyphenolase.
Acta Biochim. Polonica VI, 4, 399-409, 1959.
- 78 CATTENOZ M.
D.E.A. Faculté des Sciences de Nancy, 1967.
- 79 GORNALL A.G. FARAWILL C.J. DAVID H.M.
Determination of serum proteins by means of the Biuret
reaction.
J. Biol. Chem. 177, 751-766, 1949.
- 80 AFFELDS M.M. ROCKWOOD S.W.
Browning of acetate medium by *Herella vaginicola*
(*Achromobacter anitratus*).
Canad. J. Microbiol. 16, 325-330, 1970.
- 81 CHARLEUX J.L.
D.E.A. Faculté des Sciences de Nancy, 1968.

- 82 LAIHIA K. SUNDMAN VERONICA
A new non aromatic cyclic intermediate of bacterial lignan degradation.
Finska Kemists Medd. 78, 1, 2-10, 1969.
- 83 SUNDMAN VEPONICA, SEDERHOLM H. HARO K.
Oxidation of methoxy p. benzohydroquinone by a lignanolytic Agrobacterium strain.
Acta Chem. Scand. Danem. 22, 8, 2557-2564, 1968.
- 84 DUERRE J.A. BUCKLEY P.J.
Pigment production from tryptophan by an Achromobacter species.
J. Bacteriol., 90, 6, 1686-1691, 1965.
- 85 HOSAKAWA K. STANIER R.Y.
Crystallization and properties of p. hydroxybenzoate hydroxylase from Pseudomonas putida.
J. Biol. Chem. 241, 10, 2453-2460, 1966.
- 86 HAYAISHI O. HASHIMOTO K.
Pyrocatechase, a new enzyme catalyzing oxidative breakdown of pyrocatechin.
J. Biochem. (Tokyo) 37, 371, 1950.
- 87 KOJIMA Y. FUJISAWA H. NAKAZAWA A. NAKAZAWA T. KANETSUNA F. TANIUCHI H. NOZAKI M. HAYAISHI O.
Studies on pyrocatechase.
I. Purification and spectral properties.
J. Biol. Chem. 242, 14, 3270-3278, 1967.
- 88 HAYAISHI O. KATAGIRI M. ROTHBERG S.
Studies on oxygenases Pyrocatechase.
J. Biol. Chem. 229, 905-919, 1957.
- 89 TANIUCHI H. KOJIMA Y. NAKAZAWA A. HAYAISHI O.
Properties of pyrocatechase.
Federation Proc. 23, 429, 1964.

- 90 NAKAZAWA A. KOJIMA Y. TANIUCHI H.
Purification and properties of pyrocatechase from
Pseudomonas fluorescens.
Biochim. Biophys. Acta 147, 189-199, 1967.
- 91 HAYAISHI O.
Oxygenases. *Biological Oxidations* T.P. SINGER Ed.
Intersciences 581, 601, 1968.
- 92 DAGLEY S. STOPHER D.A.
A new mode of fission of the benzene nucleus by bacteria.
Proceed. Biochem. Soc. Biochem. J. 73 16 P, 1959.
- 93 KOJIMA Y. ITADA N. HAYAISHI O.
Metapyrocatechase : a new catechol-cleaving enzyme.
J. Biol. Chem. 236, 8, 2223-2228, 1961.
- 94 NOZAKI M. KAGAMIYAMA H. HAYAISHI O.
Crystallization and some properties of metapyrocatechase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 65-69, 1963.
- 95 MAC DONALD D.L. STANIER R.Y. INGRAHAM J.L.
The enzymatic formation of β carboxymuconic acid.
J. Biol. Chem., 210, 809-820, 1954.
- 96 CAIN R.B. CARTWRIGHT N.J.
On the properties of some aromatic ring opening enzymes of
species of the genus *Nocardia*.
Biochim. Biophys. Acta 37, 197-213, 1960.
- 97 FUJISAWA H. HAYAISHI O.
Protocatechuate 3,4 dioxxygenase.
I. Crystallization and characterization.
J. Biol. Chem. 243, 10, 2673-2681, 1968.
- 98 DAGLEY S. PATEL M.D.
Oxidation of p. cresol and related compounds by a
Pseudomonas.
Biochem. J. 66, 227-233, 1957.

- 99 TRIPPET S. DAGLEY S. STOPHER D.A.
Bacterial oxidation of protocatechnic acid.
Proceed. Biochem. Soc. Biochem. J. 76, 9 P, 1960.
- 100 DAGLEY S. EVANS W.C. RIBBONS D.W.
New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by micro-organisms.
Nature 188, 12, 560-566, 1960.
- 101 CAIN R.B. BILTON R.F. JOSEPHINE A. DARRAH
The metabolism of Aromatic Acids by microorganisms metabolic pathways in the fungi.
Biochem. J. 108, 797-828, 1968.
- 102 ORNSTON N. STANIER R.Y.
The conversion of catechol and protocatechnate to β Keto adipate by Pseudomonas Putida.
J. Biol. Chem. 241, 16, 3776-3786, 1966.
- 103 CAIN R.B.
The nature of the lactone in aromatic ring fission by Bacteria.
Proceed. Soc. Gen. Microbiol. J. Gen. Microbiol. 42, XIII 1966.
- 104 NOZAKI M. KAGAMIYAMA H. HAYAISHI O.
Metapyrocatechase. I. Purification, crystallization and some properties.
Biochem. Z. 338, 582-90, 1963.
- 105 STEVENSON I.L. MANDELSTAM J.
Induction and multi sensitive end product repression in two converging pathways degrading aromatic substances in Pseudomonas fluorescens.
Biochem. J. 96, 354-362, 1965.
- 106 GRIFFITHS E. RODRIGUES D. DAVIES J. EVANS W.C.
Ability of Vibrio O/1 to synthesize either catechol 2,3 oxygenase, depending on the primary inducer.
Biochem. J. 91, 16 P, 1964.

- 107 FARR D.R. CAIN R.B.
Catechol oxygenase induction in *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochem. J. 106, 879-885, 1968.
- 108 BIRD J.A. CAIN R.B.
Cis cis muconate, the product inducer of catechol 1,2
oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochem. J. 109, 3, 479-481, 1968.
- 109 CANOVAS J.L. STANIER R.Y.
Regulation of the enzymes of the β Ketoadipate pathway
in *Moraxella calcoacetica*.
European J. Biochem. 1, 289-300, 1967.
- 110 PALLERONI N.J. STANIER R.Y.
Regulatory mechanisms governing synthesis of the enzymes
for tryptophan oxidation by *Pseudomonas fluorescens*.
J. Gen. Microbiol. 35, 319-34, 1964.
- 111 EVANS W.C.
Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria.
Biochem. J. 41, 373-382, 1947.
- 112 KILEY B.A.
The formation of β Ketoadipic acid by bacterial fission
of Aromatic rings.
Biochem. 49, 671-674, 1951.
- 113 HARRIS G. RICKETTS R.W.
Metabolism of phenolic compounds by yeasts.
Nature 4840, 4, 473-474, 1962.
- 114 BILTON R.F. CAIN R.B.
The metabolism of aromatic acids by microorganisms.
Biochem. J. 108, 829-832, 1968.
- 115 RIESKE J.S.
Antimycin A dans Antibiotics. Volume I.
D Gottlieb et P.D. SHAW Ed. Springer Verlag
Berlin-Heidelberg-New York 542-84, 1967.

- 116 KRISHNAMURTHI V.S. BUCKLEY P.J. DUERRE J.A.
Pigment formation from L-tryptophan by a particulate
fraction from an *Achromobacter* Species.
Arch. Biochem. Biophys. 130, 1-2, 636-45, 1969.
- 117 LEVINE W G
Laccase a review dans *The Biochemistry of Copper*.
Academic Press, ed. Peisach J., 1966.
- 118 KUSTER E.
Phenol oxidases in *Streptomyces* 81-86 in *Enzyme Chemistry*
of phenolic compounds.
J.B. Pridham Pergamon Press, 1963.
- 119 ARESON W R.
Studies on the role of peroxidase in hydroxylation of
aromatic compounds.
Dissert. Abst. B. U.S.A. 28, 2, 525-526, 1967.
- 120 SAUNDERS B.C. HOLMES SIEDLE A.G. STARK B.P.
dans *Peroxidase* Butterworths London, pp 271, 1964.
- 121 ELLFOLK N.
Cytochrome c peroxidase.
Acta Chem. Scandinavica 21, 175-181, 1967.
- 122 YONETANI T. RAY G.
Studies on cytochrome c peroxydase. I. Purification and
some properties.
Biol. Chem. 240, 11, 4503-4508, 1965.
- 123 YONETANI T. RAY G.
Studies on cytochrome c peroxidase. II. Stoichiometry bet-
ween enzyme H_2O_2 and ferrocyclochrome c and enzymic deter-
mination of extinction coefficients of cytochrome c.
Biol. Chem. 240, 11, 4059-4514, 1965.
- 124 PUGH C.E.M. RAPER H.S.
The action of tyrosinase on phenols with some observations
on the classification of oxidases.
Biochem. J. 21, 1370-1383, 1927.

...

- 125 BOOTH H. SAUNDERS B.C.
Studies in peroxidase action. X. The oxidation of phenols.
J. Chem. Soc. 940-948, 1956.
- 126 WESTERFELD W.W. LOWE C.
The oxidation of p. cresol by peroxidase.
J. Biol. Chem. 145, 463-470, 1942.
- 127 CHANCE B. HERBERT D.
The enzyme substrate compounds of bacterial catalase and peroxides.
Biochem. J. 46, 402-414, 1950.
- 128 HERBERT D. PINSENT J.
Crystalline Bacterial catalase.
Biochem. J. 43, 193-202, 1948.
- 129 CLAYTON R.K.
Purified catalase from *Rhodopseudomonas spheroides*.
Biochim. Biophys. Acta, 30, 40-47, 1959.
- 130 KEILIN D. NICHOLLS P.
Reactions of catalase with hydrogen peroxide and hydrogen donors.
Biochim. Biophys. Acta 29, 302-307 1958.
- 131 NICHOLLS P. SCHONBAUM G.R.
Catalases. The Enzymes Academic Press. Vol. 8, p 147-225,
1963.
- 132 YAMANAKA T.
Pseudomonas cytochrome oxydase dans The Biochemistry of Copper, Academic Press, 1966.
- 133 VALLEE B.L. WILLIAMS R.J.P.
Metalloenzymes : The entatic nature of their active sites.
Proceed. Nat. Acad. Sci. 59, 2, 498-505, 1968.

- 134 AZOULAY E.
Influence des conditions de culture sur la respiration de *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochim. Biophys. Acta 92, 458-464, 1964.
- 135 WHITE D.C.
Cytochrome and catalase patterns during growth of *Haemophilus parainfluenzae*.
J. Bacteriol. 83, 851-859, 1962.
- 136 WHITE D.C.
Respiratory systems in the hemin-requiring *Haemophilus* species.
J. Bacteriol. 85, 84-96, 1963.
- 137 CHAIX P. PETIT J.P.
Influence du taux de croissance sur la constitution du spectre hématinique de β subtilis.
Biochim. Biophys. Acta 25, 481-486, 1957.
- 138 LENHOFF F.M. NICHOLAS D.J.D. KAPLAN N.O.
Effects of oxygen, iron, and molybdenum on rates of electron transfer in *Pseudomonas fluorescens*.
J. Biol. Chem. 220, 983-995, 1956.
- 139 GOUDA S. GREPPIN H.
Cultures à approvisionnement successif et induction respiratoire chez *Pseudomonas fluorescens*.
C. r. Soc. Phys. Hist. Nat. 1, 3, 104-113, 1966.
- 140 GREPPIN H. HORN R.
Action de la (+) catéchine sur *Pseudomonas fluorescens*.
Experientia, 25, 4, 429-430, 1969.
- 141 NAGAHISA M. AOYAMA M.
A phenolic pigment reactive to L-lactate cytochrome c reductase of yeast.
Plant. Cell. Physiol. 8, 731-736, 1967

- 142 MIYATA K. AOYAMA M. NAGAHISA M.
A phenolic pigment as a hydrogen carrier in D lactate
cytochrome c reductase system of yeast.
Plant Cell Physiol. 9, 155-157, 1968.
- 143 SCHUBERT W.J.
Metabolism of lignins
dans Metabolism of cyclic compounds.
Comprehensive Biochemistry 20, 193-230, 1968.
- 144 ISHIKAWA H. SCHUBERT W.J. NORD F.F.
Investigations on lignins and lignification.
XXVIII. The degradation by Polyporus versicolor and Fomes
fomentarius of aromatic compounds structurally related to
softwood lignin.
Arch. Biochem. Biophys. 100, 140-149, 1963.
- 145 BAVENDAMM W.
Zentr. Bakteriell. Parasitenk. Abt 76, 172, 1928.
- 146 DAVIDSON R.W. CAMPBELL W.A. BLAISDELL D.J.
Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions
on gallic or tannic acid medium
J. Agr. Res. 57, 9, 683-695, 1938.
- 147 SCHUBERT W.J.
The microbial degradation of lignin 78-118 in Lignin
Biochemistry Academic Press New York 1965.
- 148 HUSST H.M. BURGESS N.A.
Lignin and humic acids.
Soil Biochemistry (D. Mc Laren, G.H. Peterson ed)
M. Dekker New York 260-286, 1967.
- 149 ISHIKAWA H. SCHUBERT W.J. NORD F.F.
Investigations on lignins and lignification.
XXX. Enzymic degradation of guaiacylglycerol and related
compounds by White-rot fungi.
Biochem. Z. 338, 153-163, 1963.

- 150 CHRISTMAN R.F. OGLESBY R.T.
Lignins. Chemistry and utilization (K.V. Sarkanen ed.)
Wiley (Interscience) New York, 1967.
- 151 HENDERSON M.E.K.
The metabolism of aromatic compounds related to lignin
by some hyphomycetes and yeast like fungi.
J. Gen. Microbiol. 26, 155-165, 1961.
- 152 NORD F.E.
The formation of lignin and its biochemical degradation.
Geochim. Cosmochim. Acta, 28, 1507-1521, 1964.
- 153 BATISTIC L. MAYAUDON J.
Stabilité biologique dans le sol de l'acide férulique ^{14}C ,
de l'acide vanillique ^{14}C et de l'acide p. coumanique ^{14}C .
Ann. Inst. Pasteur 118, 199-206, 1970.
- 154 FLAIG W.
The chemistry of humic substances FAO/IAFA.
Rechn. Meeting Brünswick-Völkenrode 103-127, 1963.
- 155 MAYAUDON J. BATISTIC L.
Dégradation biologique de la lignine ^{14}C dans le sol.
Ann. Inst. Pasteur 118, 191-198, 1970.
- 156 DOMMERGUES Y. MANGENOT F.
Ecologie microbienne du sol.
Masson et Cie Ed. 796 pp, 1970.

Vu, approuvé et permis d'imprimer
Nancy, le

Le Président de l'Université de NANCY I
J.R. HELLUY

